

Nina Fekonja

Unapređenje metode za obogaćivanje i analizu N-glikozilacije membranskih proteina

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Olge Gornik.

Srdačno se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici doc. dr. sc. Olgi Gornik na iskazanoj susretljivosti, brojnim savjetima te neizmjerne pomoći, podršci i vodstvu prilikom izrade ovog rada. Zahvaljujem se i Tamari Pavić, mag. pharm. na strpljenju, utrošenom vremenu i pomoći kod izvođenja praktičnog dijela rada. Posebna zahvala roditeljima, obitelji i prijateljima na neprestanoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog studija. Ovaj rad posvećujem svom djedu Dragutinu koji me neizmjerne podržavao i koji bi se najviše veselio mojem uspjehu.

SADRŽAJ:

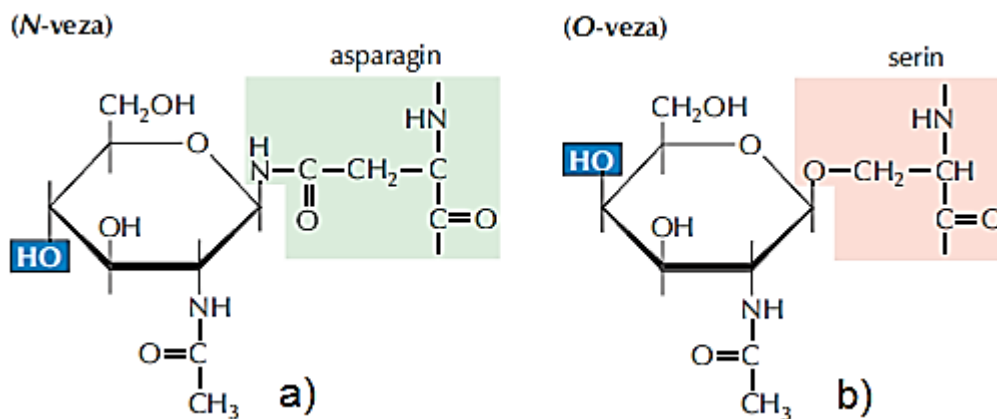
1. UVOD	1
1.1 Glikoproteini i glikozilacija	1
1.2 Važnost glikozilacije.....	3
1.3 Metode za izolaciju membranskih (gliko)proteina i analizu N-vezanih glikana	4
1.4 Razgradnja egzoglikozidzama	7
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1 MATERIJALI.....	11
3.1.1 Soli, kiseline, lužine	11
3.1.2 Organske kemikalije	11
3.1.3 Biološki materijal	12
3.1.4 Otopine i puferi.....	13
3.1.5 Pribor	15
3.1.6 Laboratorijska oprema.....	15
3.2 METODE.....	16
3.2.1 Priprema otopine Tritona X-114	16
3.2.2 Frakcioniranje proteina prema hidrofobnosti pomoću Tritona X-114	17
3.2.3 Taloženje proteina	17
3.2.3.1 Taloženje proteina acetonom	17
3.2.3.2 Taloženje proteina kombinacijom otapala kloroform/metanol/voda	17
3.2.3.3 Taloženje proteina kombinacijom otapala aceton/metanol	18
3.2.4 Otpuštanje N-vezanih glikana	18
3.2.4.1 Denaturacija	18
3.2.4.2 Deglikozilacija	18
3.2.5 Obilježavanje glikana	18
3.2.5.1 Priprema otopine 2-AB za obilježavanje	18
3.2.5.2 Obilježavanje uzoraka za 2-AB.....	18
3.2.6 Pročišćavanje obilježenih glikana	19
3.2.6.1 Priprema GHP pločice.....	19
3.2.6.2 Nanošenje 2-AB obilježenih glikana.....	19

3.2.6.3	Pročišćavanje 2-AB obilježenih N-glikana	19
3.2.6.4	Eluacija 2-AB obilježenih N-glikana	19
3.2.7	Razgradnja glikana egzoglikozidama i njihova strukturna identifikacija	19
3.2.7.1	Sakupljanje kromatografskih vršaka	19
3.2.7.2	Razgradnja glikana egzoglikozidazama	20
3.2.7.3	Ispiranje 10 kDa filter pločice.....	21
3.2.7.4	Eluacija razgrađenih glikana	21
3.2.7.5	Priprema uzoraka za UPLC.....	21
3.2.7.6	HILIC-UPLC analiza	22
3.2.7.7	Interpretacija dobivenih rezultata.....	22
3.2.8	SDS poliakrilamid gel elektroforeza	23
4.	REZULTATI.....	24
5.	RASPRAVA	32
6.	ZAKLJUČCI.....	34
7.	LITERATURA.....	35
8.	SAŽETAK/SUMMARY.....	35
8.1	SAŽETAK	38
8.2	SUMMARY.....	39

1. UVOD

1.1 Glikoproteini i glikozilacija

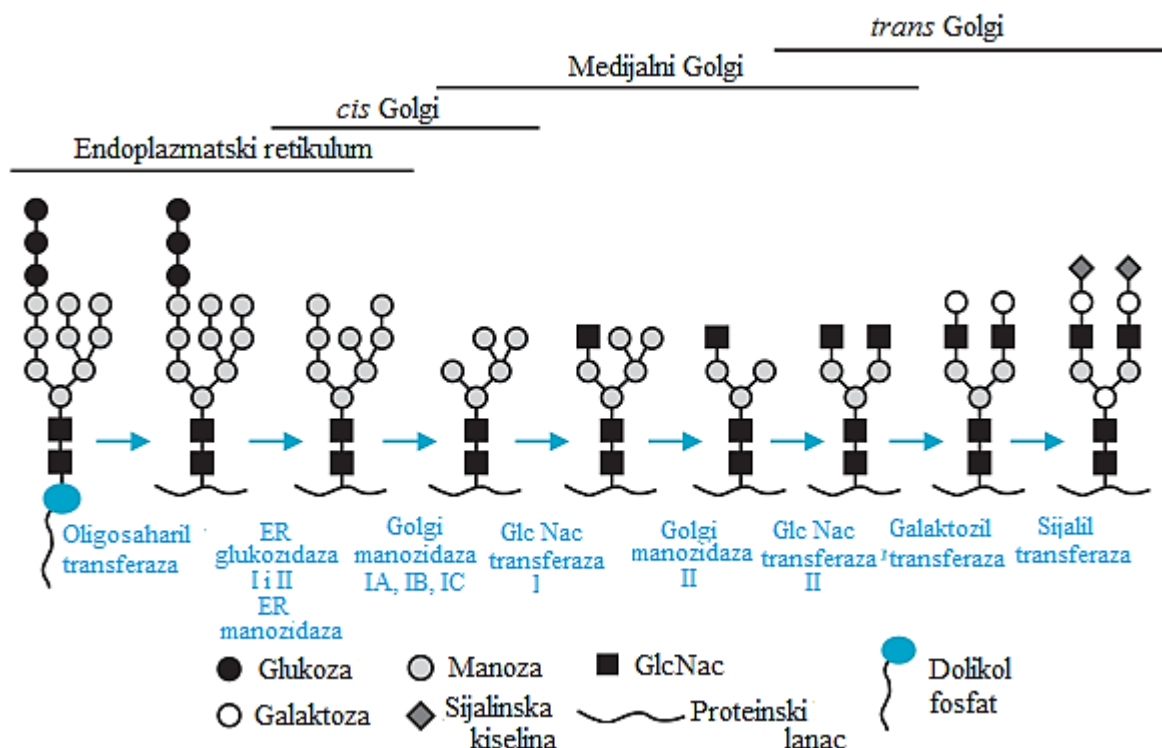
Proteini modificirani ugljikohidratima, u procesu glikozilacije, nazivaju se glikoproteini, a uglavnom se nalaze na staničnoj površini. Jezgreni i citosolni proteini također mogu biti glikozilirani (Cooper i Hausman, 2004). Glikozilacija je najučestalija posttranslacijska modifikacija proteina. To je visoko organizirani proces u kojem se dodaju i modificiraju šećeri ili glikanski ostaci na proteinima i lipidima pomoću velike mreže glikoziltransferaza i glikozidaza koje su prisutne u svim tkivima i tipovima stanica (Anugraham i sur., 2014). Promjene u glikozilacijskom profilu za posljedicu mogu imati razne bolesti poput raka, kongenitalne poremećaje, te upalne bolesti poput reumatoidnog artritisa i shizofrenije (Saldova i sur., 2014). To proizlazi iz činjenice da ugljikohidratni dio glikoproteina ima važnu ulogu u smatanju proteina koje se odvija u endoplazamtskom retikulumu, u usmjeravanju proteina u određene stanične odjeljke ili kao mjesto prepoznavanja kod međustaničnih interakcija. Postoje dvije glavne skupine glikoproteina: N- i O- vezani (Slika 1), a podjela se odnosi na mjesto vezanja ugljikohidratnog lanca. Kod N- vezanih glikoproteina ugljikohidrat je vezan na dušikov atom bočnog ogranka asparagina, dok je kod O- vezanih glikoproteina isti vezan na kisikov atom bočnog ogranka serina ili treonina (Cooper i Hausman, 2004).



Slika 1: Vrste glikoproteina a) N-vezani i b) O-vezani (preuzeto i modificirano iz Cooper i Hausman, 2004)

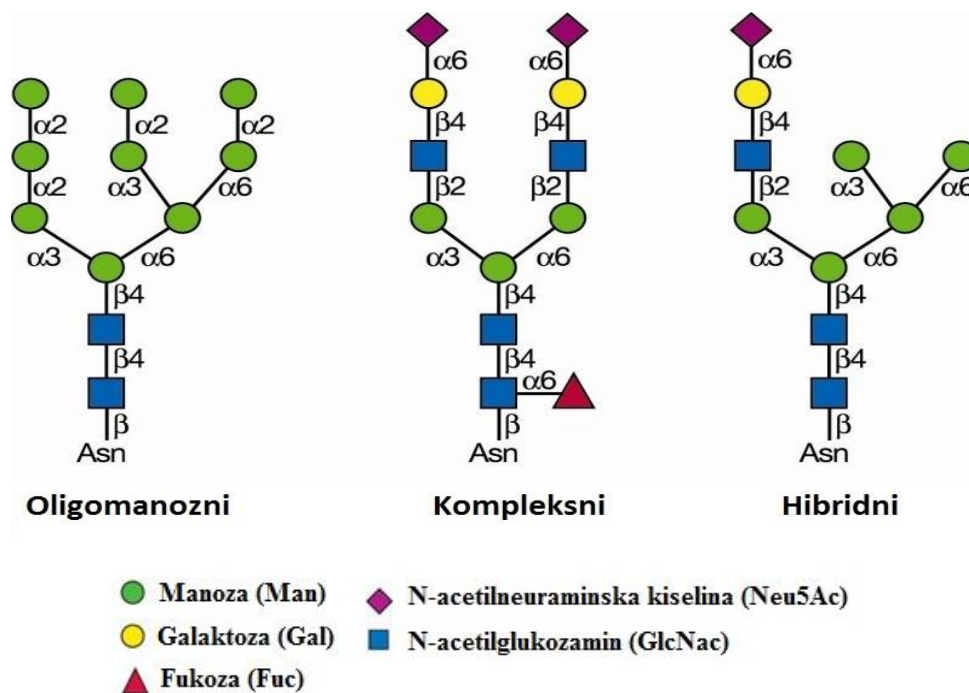
Glikozilacija započinje u endoplazmatskom retikulumu prije nego je translacija u potpunosti završena. Kod N-vezanih glikoproteina (Slika 2) prvi korak je prenošenje oligosaharida od 14 šećernih ostataka (3 glukoze, 9 manoze, 2 N-acetilgluozamina), koji je vezan za unutrašnju stranu membrane endoplazmatskog retikuluma preko dolikol-fosfatnog lipidnog nosača, na asparagin novosintetiziranog polipeptida koji je smješten u slijedu Asn-X-Thr/Ser gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina (Lauc i sur., 2009).

Novonastalom glikoproteinu se u endoplazmatskom retikulumu uklanjaju tri glukoze i jedna manaza, a daljnje modifikacije odvijaju se u Golgijevom aparatu dodavanjem i oduzimanjem šećernih jedinica. N-vezani oligosaharidi glikoproteina doraduju se u različitoj mjeri, što ovisi o enzimima (glikoziltransferazama) koji su pristuni stanici. O-vezani glikani sintetiziraju se također u Golgijevom aparatu, ali nastaju dodavanjem jednog po jednog šećera i najčešće se sastoje od samo nekoliko ostataka (Cooper i Hausman, 2004).



Slika 2: Sinteza N-vezanih glikoproteina (preuzeto i modificirano iz Drickamer i Taylor, 2006)

N-vezane glikoproteine se može svrstati u 3 glavne skupine: oligomanozni, kompleksni i hibridni tip (Slika 3), a svima je zajednička šećerna jezgra (Man α 1–6(Man α 1–3)Man β 1–4GlcNAc β 1–4GlcNAc β 1–Asn-X-Ser/Thr) (Varki i sur., 2009).



Slika 3: Glavne skupine N-vezanih glikoproteina (preuzeto i modificirano iz Varki i sur., 2009)

Oligomanozni tip nastaje iz osnovnog oligosaharida (Glc₃Man₉GlcNAc₂) uklanjanjem glukoza i nekih manoz, bez dodatka drugih šećera. Kod kompleksnog tipa uklanja se većina manoz, a se dodaju drugi šećeri, a hibridni tip je kombinacija prva dva tipa i kod njega dolazi do promjene samo jedne manozne grane dok druga ostaje nesupstituirana (Cooper i Hausman, 2004).

1.2 Važnost glikozilacije

Glikozilacija je najčešća posttranslacijska modifikacija koja doprinosi značajnim strukturnim promjenama proteina što upućuje na njezinu veliku ulogu. Ugljikohidrati mogu stvarati razgranate strukture čime se eksponencijalno povećava raznolikost takvih molekula. Pravilna glikozilacija ključna je za pravilno smatanje proteina, povećanje stabilnosti nekih proteina, staničnu signalizaciju te usmjeravanje proteina unutar stanice. Kod membranskih glikoproteina posebno je važna velika raznolikost u strukturi koja je posljedica različitih kombinacija vezanja šećera i specifičnost mjesta vezanih glikana budući da oni posreduju u međustaničnom

prepoznavanju i adheziji stanica, prepoznavanju receptora te vezanju za receptore. Također, neki glikoproteini na staničnoj površini mogu inducirati imunološku reakciju (Lodish i sur., 2004).

Varijacije u glikozilaciji proteina često vode promjeni u njihovoj funkciji, ali mogu biti povezane i s raznim bolestima. Zbog toga je iznimno važno razumijeti te promjene i njihovu povezanost s mehanizmima razvoja nekih bolesti. Prema tome, mnogi glikoproteini se u različitim bolestima mogu koristiti kao važni dijagnostički i prognostički biljezi (Axford, 2001).

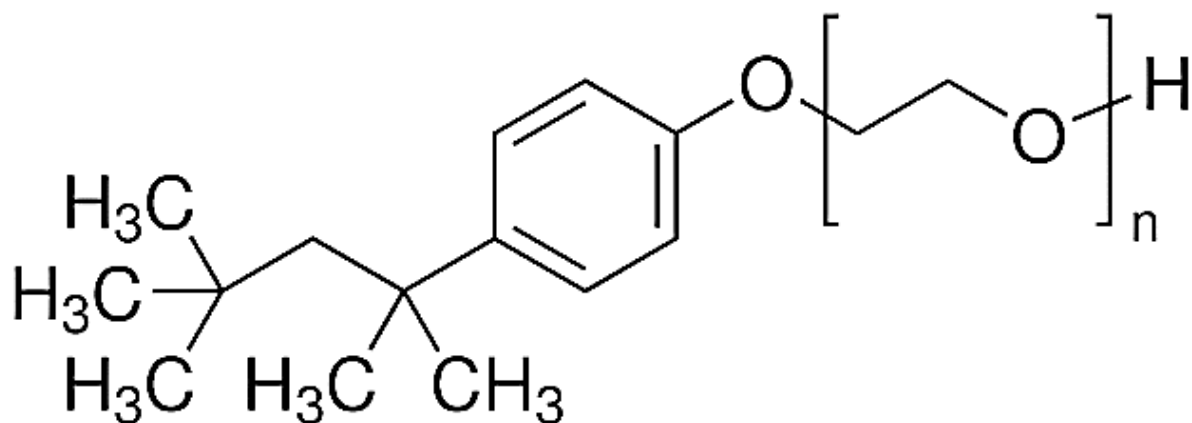
1.3 Metode za izolaciju membranskih (gliko)proteina i analizu N-vezanih glikana

Izolacija proteina iz stanične membrane i njihova strukturna analiza je zahtjevan proces zbog njihovog amfipatskog karaktera koji je uzrok slabe topljivosti u vodenim otopinama, a većina metoda je razvijena za hidrofilne proteine u vodenim otopinama. Osim hidrofobnog karaktera, sljedeći problem je mala koncentracija membranskih proteina u odnosu na citoplazmatske. Do sada postoji nekoliko metoda izolacije membranskih proteina, npr. solubilizacija membranskih proteina pomoću 90% mravlje kiseline, zatim solubilizacija sa 60% metanolom, koju slijedi digestija s tripsinom, te primjena ionskih i neionskih detergenata za solubilizaciju membrane nakon koje slijedi digestija sa endoproteinazom Lys C.

Jedna od jednostavnijih metoda izolacije je pomoću neionskih detergenata. Pogodna je zbog relativno niske cijene, jednostavnog uklanjanja surfaktanta te niske toksičnosti. Ideja je ta da neionski polioksietilen detergenti, iznad kritične micelarne koncentracije, tvore micle što je vidljivo kao zamućenje otopine. Povišenjem temperature u otopini se stvaraju dva sloja, bogat i siromašan detergetom. To je posljedica reverzibilne dehidracije polarnih glava detergenta što dovodi do formacija u vodi netopljive faze koja se izdvaja iz otopine (Schevchenko i sur., 2010). Integralne membranske proteine karakteriziraju hidrofobne domene koje su u interakciji s hidrofobnim dijelom membranskog dvosloja lipida. Prilikom razaranja stanica neionski detergent zamjenjuje membranske lipide i stvara micle s integralnim proteinima membrane. Hidrofilni proteini ne stupaju u interakciju s detergentom pa se kod povišenja temperature odvajaju u vodenu fazu. Temperatura kod koje dolazi do stvaranja micela ovisi o broju hidrofilnih oksietilen jedinica detergenta koje su kondenzirane s hidrofobnim oktilfenilnim ostatkom. Iznad temperature kod koje dolazi do zamućenja otopine, odnosno stvaranja micela,

dolazi do odvajanja hidrofilne faze, dok se faza bogata detergentom, koja sadrži hidrofobne membranske proteine, pročišćava do konačne izolacije čistih membranskih proteina.

Triton X-114 ili polioksietilen monooktilfenil eter je neionski detergent (Slika 4) koji nastaje polimerizacijom oktilfenola s etilenoksidom. Razrijeđena otopina Tritona X-114 je homogena pri 0°C, ali se kod temperatura od 23°C odvaja na vodenu fazu i fazu bogatu detergentom. Zapravo se radi o točki zamućenja. Triton X-114 se koristi za odvajanje hidrofilnih i hidrofobnih proteina nakon razaranja stanice (Bordier, 1981).



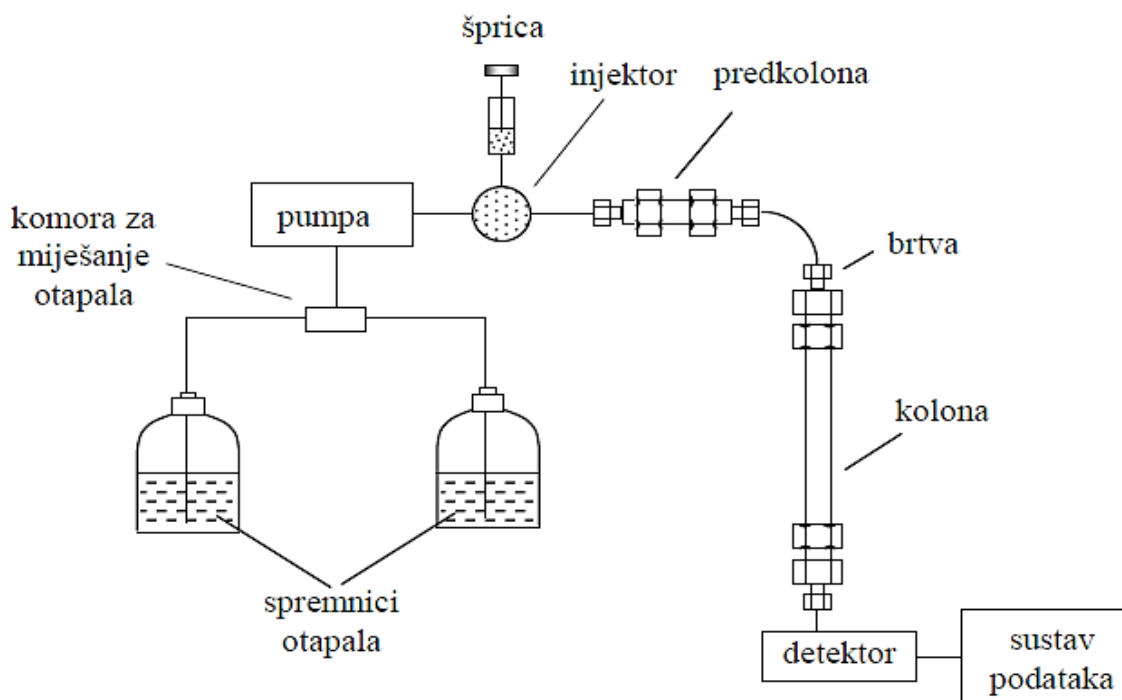
Slika 4: Struktura molekule Tritona X-114 (preuzeto sa: www.sigmaaldrich.com)

Za izolaciju membranskih proteina korištene su THP-1 stanice. To su ljudske stanice, monociti izolirani iz periferne krvi jednogodišnjeg muškog djeteta koje boluje od akutne monocitne leukemije. Te stanice imaju Fc i C3b receptore i nedostaju im površinski i citoplazmatski imunoglobulini. Karakteristika im je da mogu povećati količinu CO₂ kod fagocitoze i mogu se diferencirati u makrofazima slične stanice pomoću DMSO (www.sigmaaldrich.com).

Budući da se za analizu koriste samo N-glikani, a ne cijeli glikoproteini, treba provesti proces deglikozilacije. To se radi s enzimom PNGaza F, no obavezno se prije dodatka samog enzima dodaje Igepal koji je neionski detergent kako bi neutralizirao SDS (korišten u postupku denaturacije proteina) koji je kationski detergent. Time je osigurano da neće doći do denaturacije enzima. Kako dobiveni N-glikani nemaju kromofore i ne bi ih se moglo detektirati na kromatografskoj koloni, oni se prije analize obilježavaju s 2-aminobenzamidom u omjeru 1:1 što omogućava točno kvantitativno mjerenje i usporedbu između uzoraka. To je boja koja nema

negativni naboj, a postoje baze podataka koje sadrže pozicije elucije 2-AB obilježenih glikana u HILIC-UPLC sa fluorescentnim detektorom (Ruhaak i sur., 2010).

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu glikana najčešće se kao metoda koristi obilježavanje glikana s fluorescirajućom molekulom, koju slijedi tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) s fluorescentnim detektorom (Bigge i sur., 1995). HPLC je visoko efikasna razdjelna kromatografija koja se većinom primjenjuje kao kromatografija obrnutih faza. Kromatografija je postupak razdvajanja čistih tvari iz složenih smjesa na temelju različite brzine putovanja iona ili molekula nošenih otapalom na nepokretnoj fazi. Korištena otapala za pokretnu fazu moraju biti visoke čistoće i oslobođena otopljenih plinova ili suspendiranih čestica. Osnovni konstrukcijski dijelovi prikazani su na Slika 5 (Luterotti, 2014).



Slika 5: Osnovni dijelovi HPLC-a (preuzeto iz Luterotti, 2014)

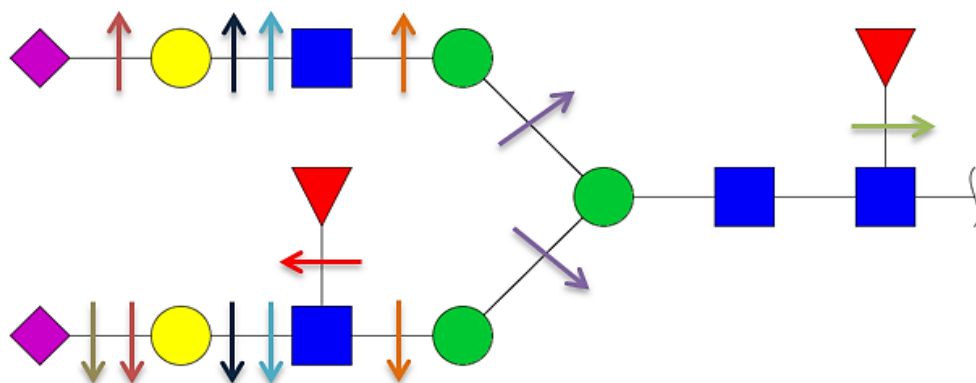
Danas se sve češće koristi tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography – UPLC*). Principi metode i selektivnost su isti kao kod HPLC. Poboljšana je osjetljivost, rezolucija, N, kapacitetni faktor i kraće vrijeme analize. Osnovna razlika između tih dviju metoda je veličina čestica stacionarne faze. Kod UPLC se koriste čestice manje od 2 μm (obično 1.7 μm), dok su kod HPLC veličine 3.5 μm . Sitne čestice

omogućavaju rad s većim brzinama protoka (viši tlak) bez gubitka efikasnosti odjeljivanja. Primjena vrlo malih čestica stacionarne faze rezultira većom površinom raspoloživom za interakcije te time boljim odjeljivanjem komponenata uzorka (Luterotti, 2014).

Za analizu glikana se najčešće koristi HILIC jer HILIC kolone jače vežu i bolje razlučuju polarne komponente glikana (sijalinske skupine). Separacija se temelji na hidrofilnom potencijalu glikana koji ovisi o njegovoj veličini, naboju, strukturi, vezama i oligosaharidnom grananju (Saldova i sur., 2014). HILIC (eng. *Hydrophilic interactions liquid chromatography*) pruža alternativni pristup razdvajanju malih polarnih molekula na polarnoj stacionarnoj fazi. To je najčešće silikagel modificiran polarnim funkcionalnim skupinama. Mobilnu fazu čini organsko otapalo mješljivo s vodom poput acetonitrila. U mobilnu fazu se najčešće dodaje amonij acetat ili amonij formijat zbog regulacije pH i ionske jakosti. Oni mogu doprinijeti i polarnosti analita te utjecati na zadržavanje na koloni. Metoda može u relativno kratkom vremenu analizirati obilježene glikanske strukture koje su prisutne u uzorku (Buszewski i Noga, 2011). Razdvajanje molekula temelji se na razdiobi analita između stacionarne i mobilne faze. Elucija se postiže povećanjem hidrofilnosti mobilne faze, odnosno povećanjem sadržaja vode. Na kraj kolone prve stižu hidrofobnije molekule, dok se hidrofilne zadržavaju duže (Boersema, 2008).

1.4 Razgradnja egzoglikozidzama

Egzoglikozidaze (Slika 6 i Tablica 1) su enzimi koji uklanjaju terminalne ugljikohidrate s nereducirajućeg kraja kompleksnog glikana, ali ne kidaju unutarnje veze ugljikohidrata (Knežević, 2011). Enzimatskim sekvenciranjem glikana može se dobiti strukturna informacija o određenoj sekvenci monosaharida i tipu veze unutar oligosaharidnog lanca. Takve informacije moguće je dobiti enzimskom razgradnjom pojedinačnog, izoliranog glikana koristeći jednu ili kombinaciju egzoglikozidaza (Kannicht i sur., 2008). Kada se razgradnja egzoglikozidazama kombinira s kromatografijom ili elektroforezom dobije se brza i učinkovita karakterizacija oligosaharida. Korištenjem položajno specifične egzoglikozidaze, mogu se identificirati glikanski ostaci (www.sigmaaldrich.com).



Slika 6: Shematski prikaz mjesta djelovanja egzoglikozidaza na glikanske strukture

Tablica 1: Popis egzoglikozidaza i njihovo djelovanje (Uchida i sur., 1979)

Egzoglikozidaza	Funkcija
ABS (<i>Arthrobacter ureafaciens</i> sijalidaza)	otpušta α 2-6, α 2-3 i α 2-8 vezanu terminalnu sijalinsku kiselinu s nereduktivnog kraja glikana (NeuNAc and NeuNGc)
AMF (α –fukozidaza bademove posije)	otpušta fukozu α 1-3 i α 1-4 vezanu (<i>ne</i> i α 1-6 fukozu vezanu za jezgru glikana)
BKF (fukozidaza iz bubrega goveda)	uklanja α 1-2 i α 1-6 vezanu fukozu s puno većim afinitetom nego α 1-3 i 4 vezanu fukozu (<i>uklanja</i> i α 1-6 fukozu vezanu za jezgru glikana)
BTG (β -galaktozidaza iz testisa goveda)	hidrolizira nereduktivnu terminalnu galaktozu β 1-3 i β 1-4 vezanu
GUH (<i>S. pneumoniae</i> heksozaminidaza, rekombinantna iz <i>E. Coli</i>)	uklanja β GlcNAc, ali ne i središnji GlcNAc β 1-4 vezan za manozu na mjestu grananja glikana
JBM (Jack bean manozidaza)	radije uklanja α 1-2 i α 1-6 manozu nego α 1-3 manozu
NAN 1 (rekombinantna sijalidaza)	otpušta α 2-3 terminalnu sijalinsku kiselinu s nereduktivnog kraja glikana (NeuNAc and NeuNGc)
SPG (<i>S. pneumoniae</i> galaktozidaza)	hidrolizira nereduktivnu terminalnu galaktozu β 1-4 vezanu

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Zbog izuzetne važnosti u međustaničnom prepoznavanju te interakcijama pojedinih molekula s receptorima na staničnoj površini (Varki i sur., 2009), analiza glikanskog dijela membranskih glikoproteina postala je važan analitički izazov. Brojni pokušaji naišli su na niz prepreka s obzirom na nedovoljnu ponovljivost metoda ili pak onečišćenje citosolnim glikoproteinima. Razaranjem stanice i taloženjem proteina dobije se precipitat ukupne proteinske frakcije. On sadrži membranske, ali i unutarstanične (gliko)proteine. Staničnim glikoproteinima proces postranslacijske modifikacije nije završen, odnosno njihova glikozilacija nije dovršena. Takvi proteini su hidrofilni proteini. Iz tog razloga analizom ukupnog proteinskog precipitata ne dobivamo valjanu informaciju o profilu membranskih N-vezanih glikana na osnovu koje možemo donositi zaključke o njihovoj ulozi u raznim (pato)fiziološkim procesima. Analiza promjene glikozilacije proteina važna je u razumijevanju patogeneze raznih bolesti kod kojih je prisutna promjena glikozilacije. Metoda izolacije glikoproteina pomoću detergenta Tritona X-114 s ciljem analize njihove N-glikozilacije HILIC-UPLC kromatografijom pokazala se reproducibilnom u ovom radu, a optimirana je na THP staničnoj liniji. Navedena metoda se temelji na razdiobi proteina prema njihovoj hidrofobnosti i omogućuje razdvajanje membranskih (hidrofobnih) proteina od solubilnih (hidrofilnih). Na taj način mogu se zasebno proučavati membranski proteini te njihov glikozilacijski profil. Najveći prinos glikoproteina pokazala je metoda precipitacije istih pomoću smjese otapala kloroform/metanol/voda (Fekonja i Goričanec, 2014).

Specifični ciljevi ovog rada su:

- Iz staničnih linija THP izolirati membranske proteine pomoću Tritona X-114
- Potvrditi da pročišćavanje proteina od detergenta pomoću smjese otapala kloroform/metanol/voda daje najveći prinos glikoproteina, a da je prinos veći ako je veća početna količina stanica
- Otpustiti i obilježiti N-vezane glikane s pročišćenih proteina te ih analizirati pomoću HILIC-UPLC kromatografije
- Pokazati reproducibilnost metode na različitoj vrsti biološkog materijala
- Potvrditi postojanje glikanskih struktura u dobivenim kromatografskim vršcima

- Strukturno identificirati N-glikane iz pojedinih kromatografskih vršaka nakon tretiranja egzogliozidazama

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Soli, kiseline, lužine

Tablica 2: Popis korištenih anorganskih kemikalija i proizvođači

Kemikalije	Proizvođač
Amonijev persulfat	Sigma – Aldrich
Dinatrij hidrogenfosfat	Acros Organics
EDTA	AnalaR, BDH
Kalij dihidrogenfosfat	Sigma – Aldrich
Kalij klorid	Sigma – Aldrich
Ledena octena kiselina	Merck
Natrij klorid	Sigma – Aldrich

3.1.2 Organske kemikalije

Tablica 3: Popis korištenih organskih kemikalija i proizvođači

Kemikalije	Proizvođač
2-aminobenzamid	Sigma – Aldrich
2-pikolin boran	Sigma – Aldrich
Aceton	Claro-prom d.o.o.
Acetonitril (ACN)	J.T.Baker
Akrilamid	Sigma
Amonijak	Merck
Bromfenol plavo	Merck
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma – Aldrich

DMSO (dimetilsulfoksid)	Sigma – Aldrich
DTT (ditiotreitol)	Sigma
Etanol	Sigma
Glicerol	Sigma
Glicin	Sigma
Izopropanol	Sigma Diagnostics
Kloroform	Riedel-de Haën
Metanol	Kemika
Mravlja kiselina	Merck
NP-40 Igepal CA630 (oktil-fenoksi-polietoksi-etanol), detergent	Sigma
SDS (natrij-dodecilsulfat), detergent	Sigma
Sukroza	Sigma
Tris	Sigma
Triton X-114	Sigma

3.1.3 Biološki materijal

Tablica 4: Popis korištenog biološkog materijala i proizvođači

Biološki materijal	Proizvođač
Koktel proteaza inhibitora	Roche
PNGaza F 1U/ 400 µl	Prozyme
Precision Plus Protein™ All Blue Standard, proteinski marker	BioRad
THP – 1	ATCC® TIB-202™

Enzimi ABS, BKF, AMF, SPG, GUH, JBM	Prozyme
-------------------------------------	---------

3.1.4 Otopine i puferi

Tablica 5: Popis korištenih otopina i pufera i način pripreme

Puferi	Priprema
10xPBS (Phosphate buffered saline) pH = 6.6	Za 1 L pufera: 80.028 g NaCl, 13.832 g Na ₂ HPO ₄ , 2.964 g KH ₂ PO ₄ , 1.976 g KCl, sve otopiti u ultra čistoj vodi
1xPBS (Phosphate buffered saline)	Za 100 ml pufera: Dobiva se iz 10xPBS-a; 10 ml 10xPBS-a uz nadopunu s miliQ vodom do 100 ml.
Pufer za nanošenje uzoraka	Za 7.5 mL pufera: 1.5 mL 1 M Tris-HCl pH=6.8, 3 mL 1 M DTT, 0.6 g SDS, 0.03 g bromfenol plavog, 2.4 mL glicerola
Pufer za elektroforezu 10x	Za 1 L: 144 g glicina, 30.2 g Tris baze, 10 g SDS-a, H ₂ O (dest.) do 1L
Pufer sa sukrozom	Za 25 mL: 1,2 g sukroze, 200 µL 1M TRIS, 2 mL 1.5M NaCl, 120 µL Stock tritona, 17,680 mL PBS-a
Triton lizirajući pufer	Za 1mL pufera: 10 µl 10 mM Tris-HCl pH=7.4, 100 µl 1.5 M NaCl-a, 100 µl 10 mM EDTA,

	500 µl 2% tritona u PBS-u, 290µl PBS-a
Otopine	Priprema
2% SDS	0.02 g SDS/1 ml; 2 g na 100 ml
2% triton u PBS-u	Dobiva se iz 10% otopine Triton X-114 (poglavlje 3.2.1)
96% acetonitril	Dobiva se iz 100% acetonitrila, razrjeđivanjem s ultra čistom H ₂ O.
Amonij formijat	Dobiva se titracijom mravlje kiseline otopinom amonijaka do pH 4.4
Coomassie blue	Za 100 mL: 25 ml izopropanola, 10 mL konc. octene kisline, 65 mL H ₂ O, 50 mg Coomassie Brilliant Blue G
70% etanol	Dobiva se iz 96% etanola razrjeđivanjem s vodom
Gel za razdvajanje 12% (elektroforeza)	Za 5 mL: 1.45 ml ultra čiste vode, 2 mL akrilamida, 1.25 mL Tris-a pH=6.8, 50 µl SDS-a, 0.25 mL amonijeva persulfata (Laemmli, 1970)
Gel za sabijanje 3% (elektroforeza)	Za 2 mL: 1.38 mL ultra čiste vode, 0.2 mL akrilamida, 0.25 mL Tris-a pH=8.8, 20 µl SDS-a, 150 µl amonijeva persulfata (Laemmli, 1970)
Otopina za obilježavanje glikana	Za 1 uzorak: 25 µl 30% octene kiseline u DMSO (7.5 µl octene kiseline, 17.5 µl DMSO), 0.48 mg 2-aminobenzamida, 1.12 mg 2-pikolin borana

3.1.5 Pribor

Tablica 6: Popis korištenog pribora i proizvođači

Pribor	Proizvođač
10 kDa filter pločica	Pall
AcroPrep 96 GHP filter pločice, promjera 0.45 µm, zapremnine 1 ml	Pall
Adhezivni filmovi	Mettler Toledo
Kolona za kromatografiju	Waters ACQUITY UPLC® BEH Glycan 1.7 µm
Mikrotube za centrifugiranje	Eppendorf
Nastavci za mikropipete (20 µl, 200 µl, 250 µl, 1000 µl)	Rainin
PCR pločica od 300 µl	Mettler Toledo
Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 1 ml zapremnine, za 96 uzoraka	Waters
Vijale	Waters

3.1.6 Laboratorijska oprema

Tablica 7: Popis laboratorijske opreme i proizvođači

Pribor	Proizvođač
Acquity UPLC®	Waters
Aparatura za SDS PAGE	Cleaver scientific Ltd.
Centrifuga 5424 R	Eppendorf
Centrifuga Eppendorf 5804	Eppendorf
Centrifuga Jouan MR23i	Thermo Electron

Centriguga Microfuge 22R	Beckman Coulter™
Electrophoresis power supply EPS 301	Amersham Biosciences
Inkubator DNI 30	M.R.C Ltd.
Mikropipete (obične i multikanalne)	Rainin
Sonikator UP100H Ultrasonic Processor	Hielscher
SpeedVac Concentrator Savant SC210A	Thermo scientific
Termo tresilica TS-100	Biosan
Tresilica	IKA® - Schüttler
Vakuum Manifold	Pall
Vortex	Biosan

3.2 METODE

3.2.1 Priprema otopine Tritona X-114

PBS se ohladi na +4°C i napravi se 2%-tna (w/v) otopina Tritona X-114. Temperaturu je potrebno kontrolirati (niža od +8°C, a optimalna temperatura je +4°C) zbog toga što je triton topljiv na nižoj temperaturi, dok na višim temperaturama stvara micelle. Navedeno svojstvo se koristi za pročišćavanje same otopine jer komercijalno dostupan Triton X-114 nije dovoljno čist.

Nakon potpunog otapanja detergenta u PBS-u, otopina se zagrije na +35°C (termostat). To je temperatura na kojoj Triton X-114 formira micelle pa otopina postane mliječno bijela. Temperatura otopine se kontrolira i drži konstantnom na 35°C. Dobivena emulzija centrifugira se na 5000 x g/10 min na temperaturi od 35°C te se dobiju dvije faze. Donja faza je čista otopina Tritona X-114, a u gornjoj fazi se nalaze nečistoće. Koncentracija Tritona X-114 u donjoj fazi je oko 10%. On se ohladi na +4°C i čuva u hladnjaku, a prije ekstrakcije se razrijedi 10x s hladnim PBS-om (Bordier, 1981).

3.2.2 Frakcioniranje proteina prema hidrofobnosti pomoću Tritona X-114

Za ekstrakciju membranskih i hidrofilnih proteina korištene su THP stanice. One se homogeniziraju s 1 mL Triton lizirajućeg pufera, kojem se dodaje koktel proteaza inhibitora kako bi se spriječila razgradnja proteina, pomoću sonikatora u 4 ciklusa od po 10-15 sekundi. Homogenizirani uzorci se inkubiraju 1 h na 4°C uz blago miješanje, a potom se centrifugiraju 30 min (10 000 x g, 4°C). U talogu zaostanu dijelovi stanica, a čisti supernatant se prenese u nove mikrotubice te se inkubira 5 min na 37°C nakon čega je vidljivo zamućenje otopine. Uzorci se zatim centrifugiraju 3 min (400 x g, 37°C) da bi se formirale dvije faze, od kojih je vodena gornja, a detergent donja faza. Gornja, vodena frakcija se prenese u novu mikrotubicu i inkubira na ledu, dok se tritonska faza resuspendira s 500 µL hladnog PBS-a i proces separacije se ponovi kako bi se dodatno uklonili solubilni proteini eventualno zaostali u fazi bogatoj detergentom (centrifugira se 3 min na 400 x g, 37°C). Gornja, vodena faza se ponovno ukloni i spoji s vodenom fazom dobivenom u prvoj separaciji. Frakcija bogata detergentom resuspendira se s 1,5 mL hladnog PBS-a (Schevchenko i sur., 2010).

3.2.3 Taloženje proteina

3.2.3.1 Taloženje proteina acetonom

Aceton se ohladi na -20°C. Uzorcima (tritonskoj i solubilnoj frakciji) se doda 4 puta veći volumen hladnog acetona. Vorteksira se i inkubira 60 min na -20°C. Nakon toga se centrifugira 10 minuta na 15 000 x g, supernatant se pažljivo dekantira. Ostavi se da aceton ispari u Speed-Vac-u (Wessel i Flugge, 1984).

3.2.3.2 Taloženje proteina kombinacijom otapala kloroform/metanol/voda

Uzme se alikvot od 200 µL vodene frakcije i isto toliko tritonske frakcije i svaka se zasebno pomiješa s 800 µL metanola, vorteksira te centrifugira 30 s na 9000 x g. Zatim se doda 400 µL kloroforma, vorteksira i centrifugira 30 s na 9000 x g. Sljedeće se doda 600 µL hladne ultračiste vode, uzorci se snažno vorteksiraju te centrifugiraju 1 min na 9000 x g. Gornja vodena faza se pažljivo odstrani. Ponovno se doda 800 µL metanola, uzorci se promiješaju i centrifugiraju 2 min na 9000 x g. Supernatant se odstrani, a skupljeni proteini se osuše u Speed-Vac-u (Wessel i Flugge, 1984).

3.2.3.3 Taloženje proteina kombinacijom otapala aceton/metanol

Uzme se alikvot od 100 μ L vodene frakcije i isto toliko frakcije bogate detergentom i svaka se zasebno pomiješa s 1,4 mL ledene mješavine aceton/metanol (8:1) te se inkubiraju 90 min na 4°C. Agregirani proteini se istalože centrifugiranjem na 2800 x g, na 4°C, 15 minuta. Supernatant se odbaci, a proteinski precipitat se osuši u Speed-Vac-u (Mastro i Hall, 1999).

3.2.4 Otpuštanje N-vezanih glikana

3.2.4.1 Denaturacija

30 μ L 1.33% SDS-a se doda svakom uzorku i snažno promiješa pipetom. Uzorci se inkubiraju na 65°C 10 minuta. Po završetku inkubacije uzorak se 30 minuta hladi na sobnoj temperaturi. Zatim se doda svakom uzorku 10 μ L 4% Igepala i opet promiješa pipetom. Stalak sa uzorcima se ostavi na tresilici 15 minuta i tada su spremni za dodatak mješavine enzima (Menni i sur., 2013).

3.2.4.2 Deglikozilacija

Mješavina enzima pripremi se mješanjem 10 μ L 5 x PBS-a sa 0.12 μ L PNG-aze F po uzorku. Prije pipetiranja PNG-aze F treba ju snažno protresti. Svakom uzorku doda se 10 μ L mješavine enzime te snažno promiješa pipetom. Uzorci se ostave inkubirati 18 sati na 37°C (Menni i sur., 2013).

3.2.5 Obilježavanje glikana

3.2.5.1 Priprema otopine 2-AB za obilježavanje

Otopina za obilježavanje izradi se po propisu (poglavlje 3.1.4) za zadani broj uzoraka. Prije vaganja, 2-pikolin boran stavlja se na sobnu temperaturu. Prvo se izračunata količina octene kiseline doda u određeni volumen DMSO-a kako bi dobili 30% otopinu. Ta 30% octena kiselina u DMSO se doda u mikrotubicu u kojoj se nalazi izvagani 2-AB te se vorteksira dok se potpuno ne otopi. Sav sadržaj se prenese u drugu mikrotubicu u kojoj se nalazi izvagani pikolin boran i dobro promiješa do trenutka kad se potpuno otopio (Menni i sur., 2013).

3.2.5.2 Obilježavanje uzoraka za 2-AB

Svakom uzorku doda se po 25 μ L otopine za obilježavanje i smjesa se dobro promiješa pipetom. Stalak sa uzorcima se trese 10 min na tresilici, a zatim se stavi u inkubator na 65°C na 2 sata. Izvadi se nakon isteka vremena i ostavi hladiti 30 min na sobnoj temperaturi (Menni i sur., 2013).

3.2.6 Pročišćavanje obilježenih glikana

3.2.6.1 Priprema GHP pločice

Ispiranje GHP pločice provodi se sa 200 μ L 70% etanola koji se pipetira u svaku jažicu nakon čega se ukloni pomoću vakuum pumpe do suhog, pri čemu tlak ne smije prelaziti 5 inHg. Nakon toga ponovi se postupak sa 200 μ L ultračiste vode i na kraju sa 200 μ L hladnog 96% ACN-a (Menni i sur., 2013).

3.2.6.2 Nanošenje 2-AB obilježenih glikana

Svakom 2-AB obilježenom glikanu doda se 700 μ L hladnog 100% ACN-a, promiješa pipetom i istim nastavkom pipete prenese ukupan volumen na GHP pločicu. Inkubira se 2 minute i vakuumira do suhog (Menni i sur., 2013).

3.2.6.3 Pročišćavanje 2-AB obilježenih N-glikana

200 μ L hladnog 96% ACN-a (koji je pripremljen neposredno prije i ohlađen na 4°C) se pipetira u svaku jažicu GHP pločice i vakuumira do suhog. Postupak se ponovi 4x. Nakon toga GHP pločica se stavi na pločicu za sakupljanje uzoraka zapremnine 1 mL, a u jažice se pipetira 200 μ L hladnog 96% ACN-a. Sve zajedno centrifugira se 5 minuta na 1000 rpm (Menni i sur., 2013).

3.2.6.4 Eluacija 2-AB obilježenih N-glikana

GHP pločica se stavi na PCR pločicu. Doda se 90 μ L ultračiste vode u svaku jažicu GHP pločice i ostavi, zajedno sa PCR pločicom, na tresilici 15 minuta. Nakon toga se pločice centrifugiraju 5 minuta na 1000 rpm kako bi se skupila prva frakcija eluata u PCR pločicu. Ponovi se postupak kako bi se sakupila i druga frakcija eluata u PCR pločicu. Nakon što se provjeri da nema nikakvih kapljica ispod GHP pločice, na PCR pločicu se stavi poklopac i pločica se pospremi u frižider (Menni i sur., 2013).

3.2.7 Razgradnja glikana egzoglikozidama i njihova strukturna identifikacija

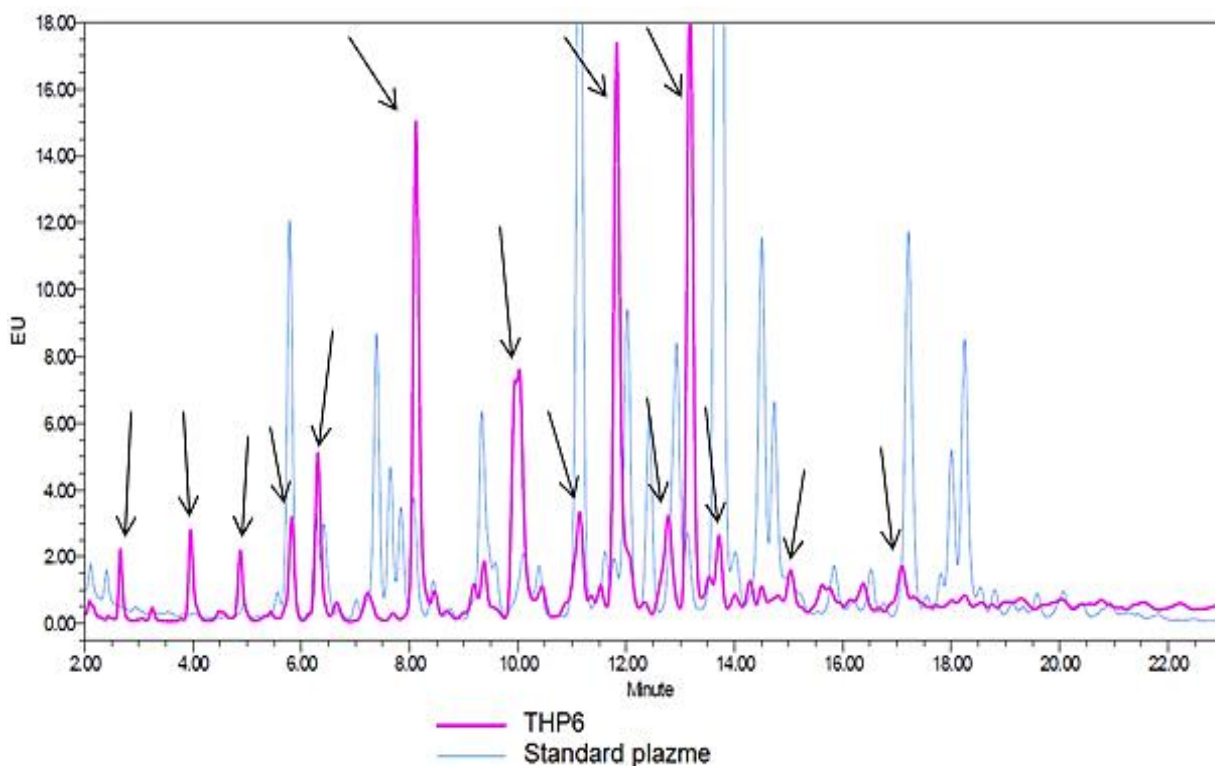
3.2.7.1 Sakupljanje kromatografskih vršaka

2-AB obilježeni glikani s membrane THP stanica su početni uzorci. 150 μ L uzoraka THP5, THP6 i THP7 se spoji i ukoncentrira. Ista procedura napravljena je sa uzorcima THP2 i THP3. Spojeni uzorci THP5-7 i THP2-3 resuspendirani su u 15 μ L ultračiste vode. Za UPLC kromatografiju i sakupljanje kromatografskih vršaka, uzorci su pripremljeni na način opisan u Tablica 8.

Tablica 8: Priprema uzoraka za kromatografsku analizu

Sakupljanje pikova	Uzorak	Volumen uzorka (μL)	Volumen ACN-a (μL)	Volumen za injektiranje na kolonu (μL)
1.	THP5-7	12,5	37,5	40
2. i 3.	THP2-3	2x7,5	22,5	20

Na ekranu se prati detekcija i u tubice se sakupljaju željeni kromatografski vršci. U svakoj analizi sakupljeno je 14 vršaka (Slika 7). Tubice sa glikanima se stave sušiti.



Slika 7: Prikaz sakupljenih kromatografskih vršaka

3.2.7.2 Razgradnja glikana egzoglikozidazama

Sakupljeni osušeni kromatografski vršci se resuspendiraju sa 37 μL ultračiste vode. Digestija egzoglikozidazama provodi se na svakom sakupljenom vršku individualno. Digestija se provodi u PCR pločici. Ovakva enzim/pufer/uzorak mješavina inkubira se 18 sati na 37°C (Tablica 9).

Tablica 9: Shema razgradnje glikana egzoglikozidazama

Red	Egzoglikozidaza (Tablica 1)	Kromatografski vršak 1-14		
		Enzim (μL)	Specifični pufer (μL)	Uzorak (μL)
A	ABS	1	1	3
B	JBM	2	2	6
C	ABS+BKF	2x1	2x0.5	2
D	ABS+AMF	2x1	2x0.5	2
E	ABS+AMF+SPG	3x1	3x0.67	5
F	ABS+BKF+AMF+SPG+GUH	5x1	5x0.4	3
G	ABS+BKF+AMF+SPG+GUH → JBM	5x1 → 2	5x0.4 → 2	3 → 6

3.2.7.3 Ispiranje 10 kDa filter pločice

U filter pločicu stavi se 100 μL ultračiste vode i 100 μL 50% acetonitrila te se vakuumom filtrira. Ponovi se postupak sa 200 μL ultračiste vode. Filtrat se baci.

3.2.7.4 Eluacija razgrađenih glikana

50 μL ultračiste vode doda se uzorcima na PCR pločici te se pločica stavi na tresilicu nekoliko minuta. Isprana filter pločica stavi se na pločicu za sakupljanje uzoraka (zapremnine 1 mL) i ne skida se do kraja procesa. Kompletan količina uzorka iz PCR pločice prenese se na 10 kDa filter pločicu. Vakuumom se filtrira u pločicu za sakupljanje uzoraka. Ponovno se doda 50 μL ultračiste vode u PCR pločicu i ponovi postupak. Nakon toga doda se 100 μL ultračiste vode direktno u filter pločicu i također se filtrira vakuumom u istu pločicu za sakupljanje uzoraka. Filter pločica se baci, a pločica za sakupljanje uzoraka stavi se u speed vac kako bi se osušili glikani. Red G svakog vrška resuspendira se sa 6 μL ultračiste vode i ponovi se postupak digestije sa enzimom JBM.

3.2.7.5 Priprema uzoraka za UPLC

Uzorci se pripreme na način da sadrže 25% vode i 75% acetonitrila. U uzorke se prvo doda 12.5 μL ultračiste vode te se oni stave na tresilicu. Nakon toga doda se 37.5 μL acetonitrila. Svaki uzorak pripremi se u količini od 50 μL, te se prenesu u vijale. Na kolonu se injektira 40 μL uzorka. Također pripremi se vijala sa 60 μL ultračiste vode, u sljedeću se stavi 10 μL dekstrana i 30 μL acetonitrila, a u treću 20 μL standarda plazme i 60 μL acetonitrila.

3.2.7.6 HILIC-UPLC analiza

Dobiveni glikani analizirani su tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama (poglavlje 1.3). Kromatograf se programira na način da je temperatura uzorka 10°C, a temperatura kolone 25°C. Prije injektiranja uzorka na kolonu se redom injektira 10 µL ultračiste vode, 10 µL otopine dekstrana i 30 µL otopine standarda plazme. Nakon toga slijedi injektiranje čistog uzorka, te uzoraka digestiranih egzoglikozidazama. Razdvajanje N-glikana je provedeno na Acquity UPLC BEH Glycan koloni. Korišten gradijentni protok otapala prikazan je u Tablica 10. Kromatografska analiza je provedena tijekom 32.5 min, a glikani su detektirani fluorescentnim detektorom s valnim duljinama ekscitacije i emisije za 2-AB koje iznose 250 odnosno 428 nm (Menni i sur., 2013).

Tablica 10: Omjer otapala korištenih za gradijentni protok u analizi glikana tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti; otapalo A - 100 mM amonijev formijat, otapalo B - acetonitril

Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
0.00	0.561	30	70
24.81	0.561	47	53
25.50	0.250	100	00
29.00	0.250	30	70
32.50	0.561	30	70

3.2.7.7 Interpretacija dobivenih rezultata

Dobiveni kromatogrami se interpretiraju na način da se kromatogram netretiranog uzorka uspoređuje sa kromatogramima uzoraka tretiranih enzimima (Slika 15 i Slika 16). Prethodno se usporedbom retencijskog vremena sakupljenog vrška s N-glikanskim kromatografskim profilom standarda plazme (kojem je poznat sastav N-glikana) pridruže potencijalne glikanske strukture. U određivanju glikanskih struktura unutar kromatografskog vrška upotrebljava se i GU vrijednost (dobivena kalibracijom pomoću vanjskog standarda; glukoznog homopolimera, dekstrana), na način da se dobivene GU jedinice uspoređuju s vrijednostima GU u bazi podataka Glycibase. To je baza podataka koja sadrži vremena elucije 2-AB obilježenih N-glikana analiziranih HPLC-om zajedno sa pretpostavljenim produktima nakon digestije egzoglikozidazama (Campbell i sur., 2008).

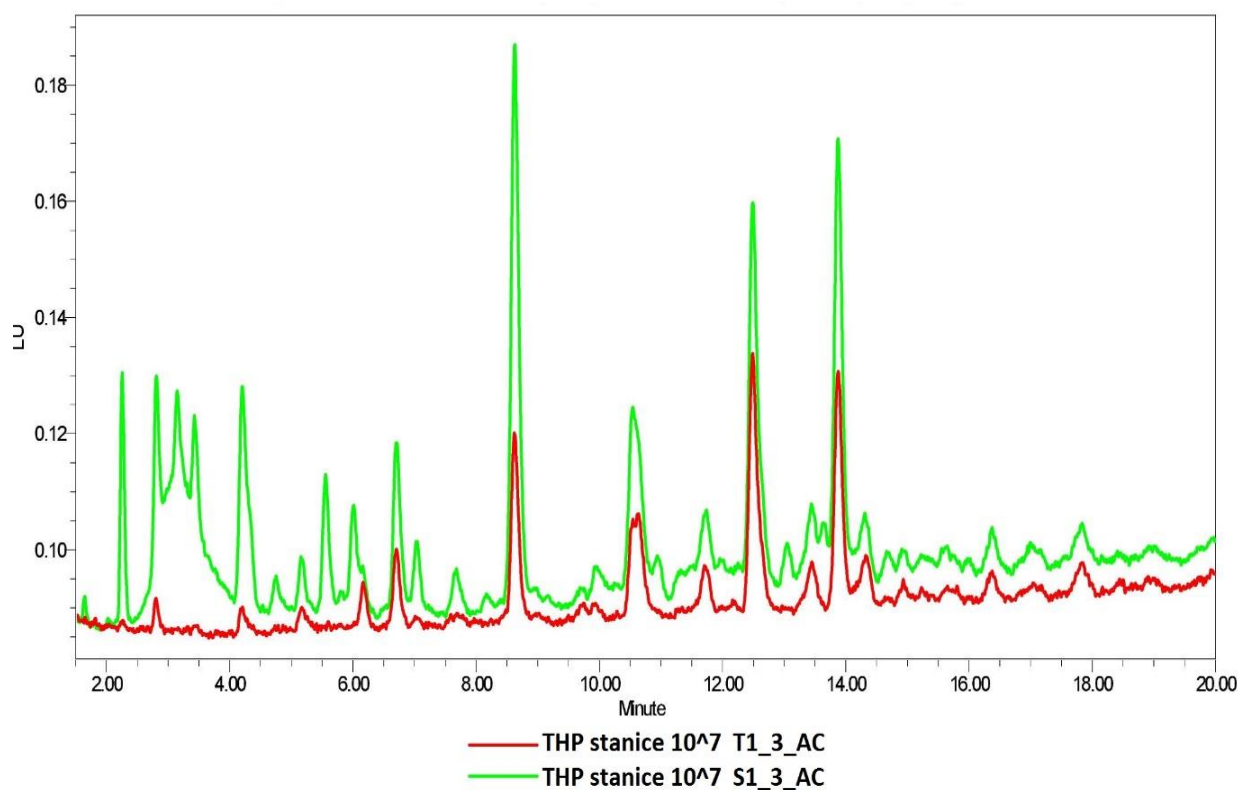
3.2.8 SDS poliakrilamid gel elektroforeza

Sastavi se standardna komora za elektroforezu, pri čemu stakla za elektroforezu moraju biti čista, suha i dobro učvršćena. Najprije se pripremi razdvajajući gel (12% poliakrilamid) (Tablica 5) koji se izlije između stakala za elektroforezu, te se na vrh gela odmah doda izopropanol, kako bi se spriječio pristup zraku koji usporava polimerizaciju. Razdvajajući gel polimerizira u vremenu od 20 – 30 min te se nakon toga ukloni izopropanol i površina gela se ispere ultračistom vodom. Pripremi se otopina za sabijajući gel (3% poliakrilamid) (Tablica 5) i prenese između stakala za elektroforezu, a između stakala se odmah umetne i češalj za elektroforezu. Nakon polimerizacije sabijajućeg gela, češalj se ukloni, a nastale jažice se dobro isperu vodom (Laemmli, 1970).

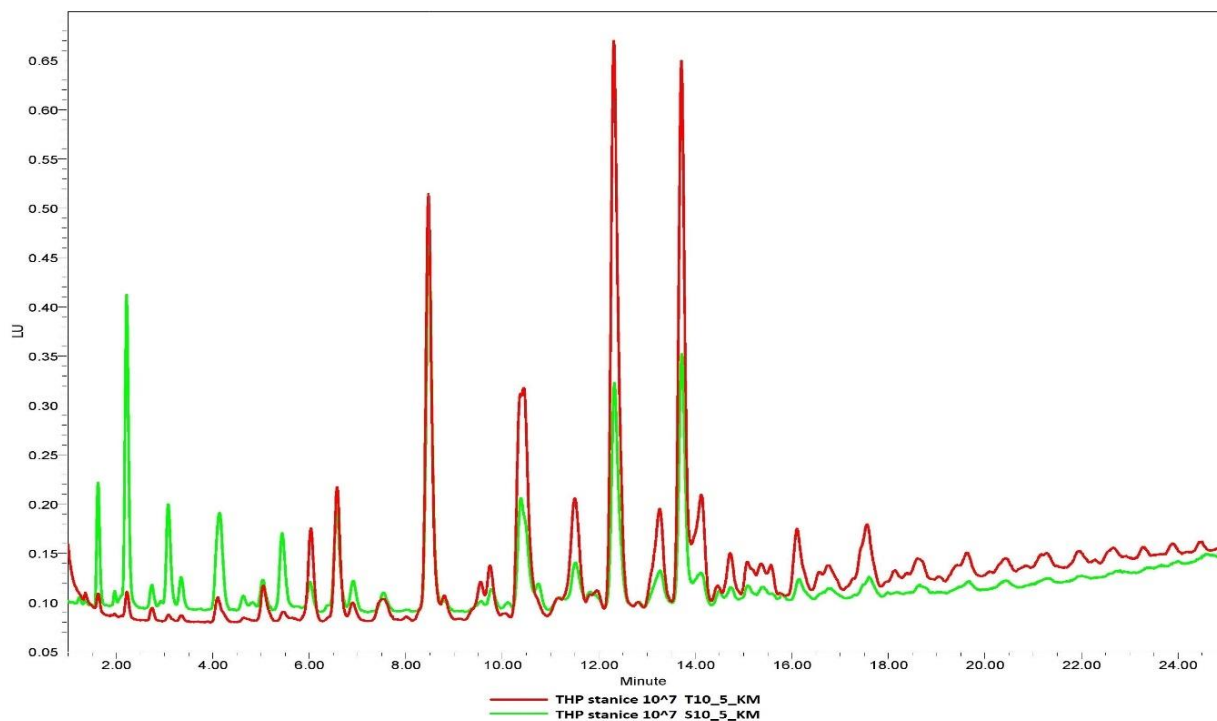
Osušeni dobiveni talog sa proteinima u tubicama resuspendira se sa 10 μ L 2% SDS-a. Alikvot od 1 μ L iz svake tubice sa talogom tritonske frakcije prenese se u novu tubicu i pomiješa se sa 7 μ L vode i 2 μ L pufera za nanošenje uzorka. Iz tubica sa talogom solubilne frakcije uzme se alikvot od 2 μ L i pomiješa sa 6 μ L vode i 2 μ L pufera za nanošenje uzorka. Tako pripremljeni uzorci stave se u termo blok (95°C) 5 minuta. Stalak s gelom prebaci se u uređaj za izvođenje elektroforeze te se unutarnja kadica napuni puferom za elektroforezu. Svih 10 μ L uzorka i 5 μ L markera nanese se u jažice na gel, te se tada i vanjska kadica napuni puferom za elektroforezu, a na uređaj priključe elektrode i pokrene se elektroforeza: 30 min pri naponu od 80 V (da uzorci stignu do razdvajajućeg gela) te 90 min pri naponu od 120 V. Nakon provedene elektroforeze, izvade se stakla sa gelom i isperu destiliranom vodom. Kad se stakla razdvoje, gel se pažljivo prebaci u kadicu sa destiliranom vodom jer ne smije ostati suh. Nakon toga se voda odstrani i brzo doda boja Coomassie Blue (Tablica 5) tako da prekrije gel. Kadica sa bojom i gelom stavi se na tresilicu 20 minuta, a nakon toga se odstrani boja i gel prenese u 1 L prethodno uzavrele destilirane vode i ostavi da vrije 10 minuta kako bi se gel odbojao. Gel je nakon toga spreman za slikanje i interpretaciju rezultata.

4. REZULTATI

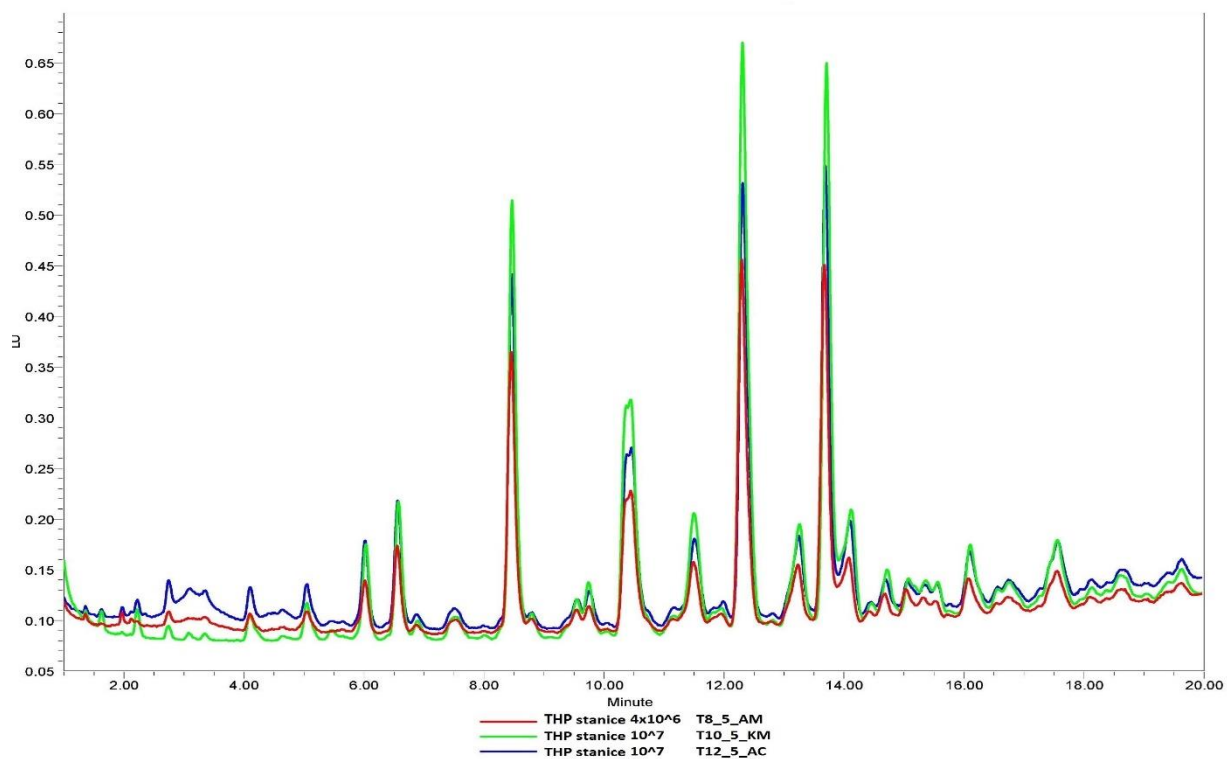
Membranski i hidrofilni proteini izolirani su iz THP stanica u količini od 10^7 i $4 \cdot 10^6$ stanica te su ekstrahirani pomoću detergenta Tritona X-114 (poglavlje 3.2.2). Nakon točke zamućenja dobivene su dvije faze, gornja frakcija s hidrofilnim proteinima koji su topljivi u vodi, a donja faza sadrži Triton X-114 u obliku micela s uklopljenim hidrofobnim membranskim proteinima. Kako se u pethodnim pokušajima precipitacije proteina sa spin filterima nisu dobili zadovoljavajući rezultati (Fekonja i Goričanec, 2014), ovaj put se nakon pročišćavanja proteina pristupilo precipitaciji proteina iz donje tritonske frakcije pomoću različitih kombinacija organskih otapala: aceton, kloroform/metanol i aceton/metanol (poglavlje 3.2.3). Dobiveni proteini su zatim deglikozilirani (poglavlje 3.2.4), 2-AB obilježeni (poglavlje 3.2.5), obilježeni N-glikani izolirani (poglavlje 3.2.6), te analizirani UPLC-om (poglavlje 3.2.7.6).



Slika 8: Kromatogram N-glikana dobivenih precipitacijom membranskih proteina acetonom (crveno) i usporedba s N-glikanima solubilnih proteina (zeleno).

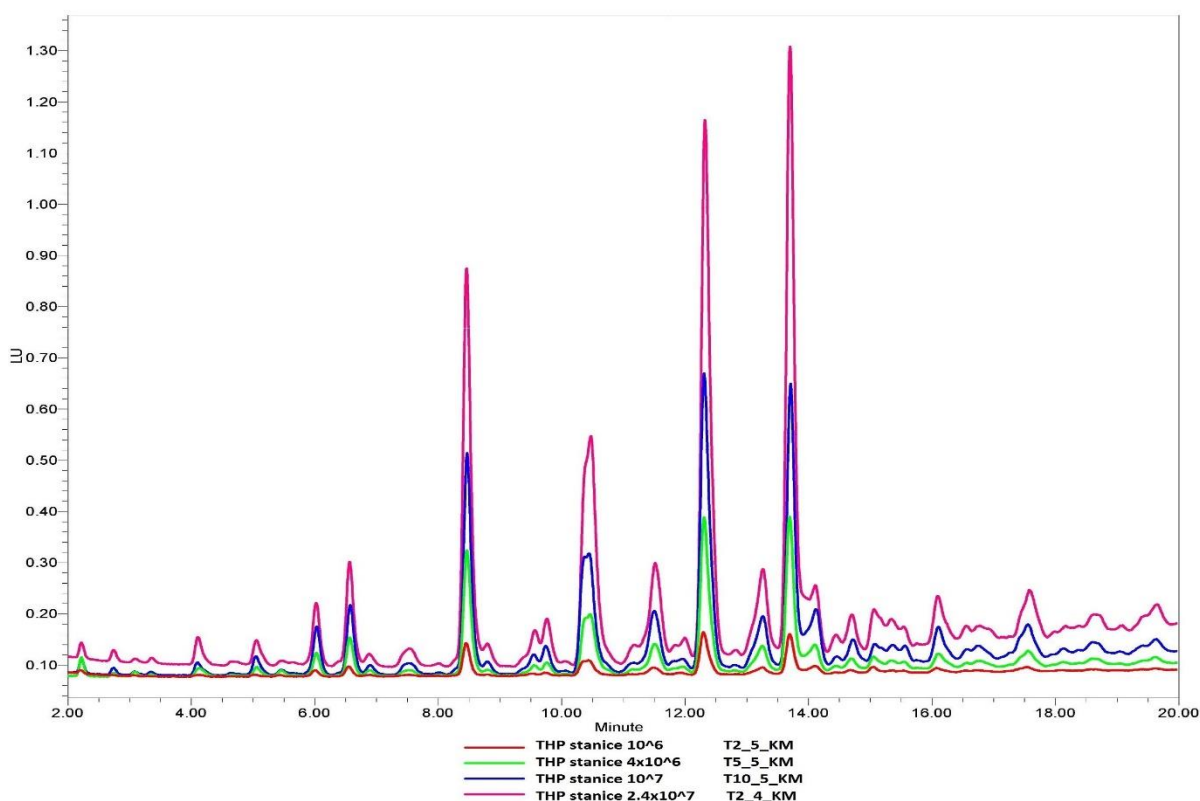


Slika 10: Kromatogram N-glikana dobivenih precipitacijom membranskih proteina organskim otapalom kloroform/metanol (crveno) i usporedba s N-glikanima solubilnih proteina (zeleno).

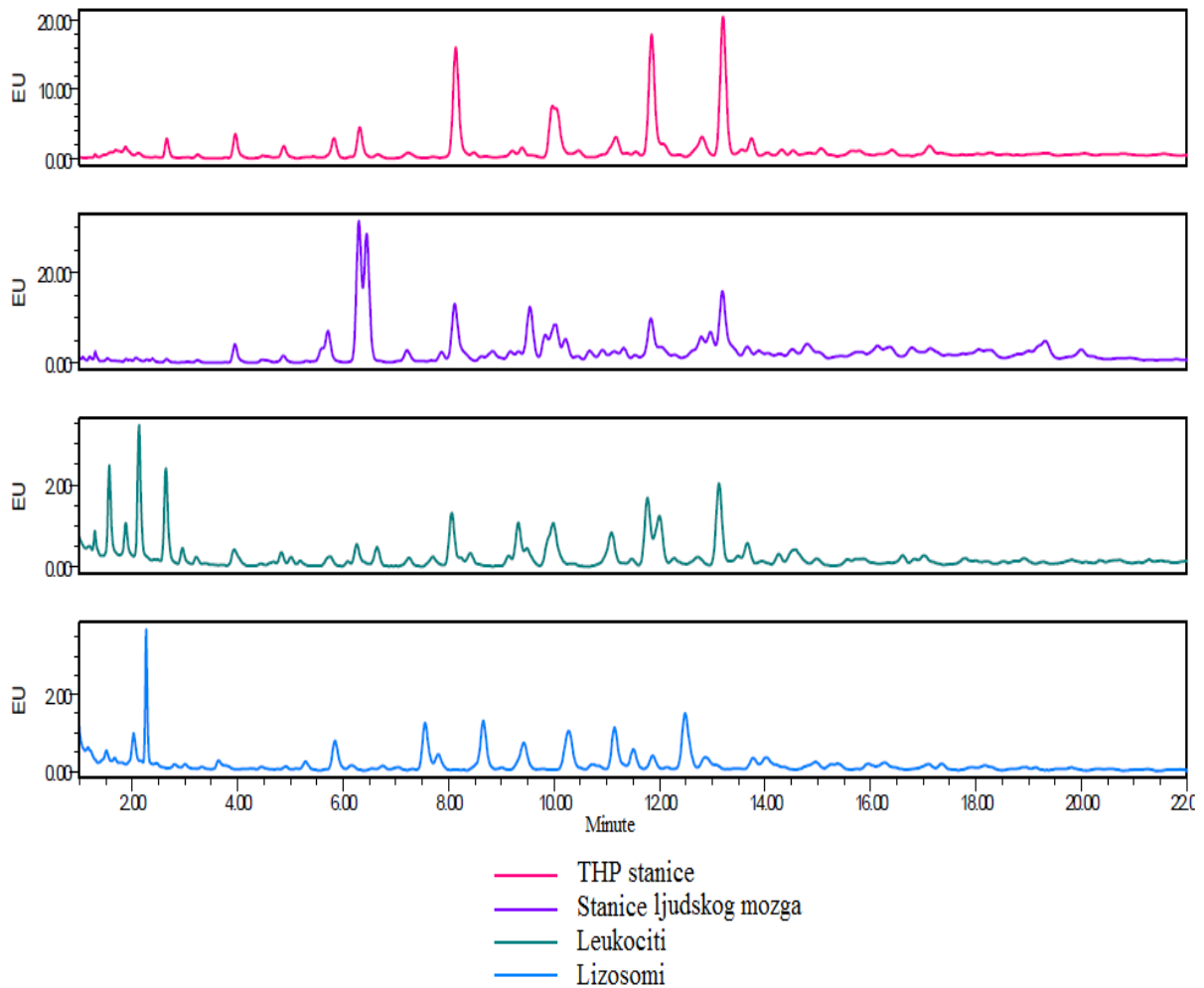


Slika 9: Kromatogrami N-glikana otpuštenih s membranskih proteina THP stanica nakon različitih metoda precipitacije proteina: aceton (plavo), kloroform/metanol (zeleno), aceton/metanol (crveno)

Sve tri različite metode precipitacije proteina (poglavlje 3.2.3.1-3.2.3.3) daju zadovoljavajući prinos N-glikana (Slika 9) te kromatograme jednakog glikanskog profila. Ta činjenica je bitna jer potvrđuje dosljednost glikanskog profila. Međutim, najveći prinos glikana daje precipitacija proteina pomoću kombinacije organskih otapala kloroform/metanol (Slika 10). Usporedbom kromatograma N-glikana otpuštenih s proteina iz tritonske i solubilne frakcije (Slika 8 i Slika 10) vidi se da su u tritonskoj frakciji prisutni glikoproteini s kompleksnijim glikanskim strukturama (dovršeni glikoproteini) koji izlaze iz kromatografske kolone kasnije, dok u solubilnoj fazi ima više proteina sa strukturno jednostavnijim N-vezanim glikanima koji izlaze iz kromatografske kolone vrlo rano. Nadalje, uspoređeni su kromatografski vršci N-glikana koji su izolirani kombinacijom otapala kloroform/metanol, ali s različitom početnom količinom THP stanica (10^6 , $4 \cdot 10^6$, 10^7 , $2.4 \cdot 10^7$). Jasno se može uočiti da je s povećanjem broja ishodnih stanica veći prinos proteina, a samim time i N-glikana (Slika 11).



Slika 11: Kromatogrami N-glikana dobivenih precipitacijom membranskih proteina kombinacijom organskih otapala kloroform/metanol s različitom početnom količinom stanica (10^6 stanica - crveno, $4 \cdot 10^6$ stanica - zeleno, 10^7 stanica - plavo, $2.4 \cdot 10^7$ stanica - ružičasto)



Slika 12: Kromatogram N-glikana THP stanica, stanica ljudskog mozga, leukocita i lizosoma iz tritonske frakcije dobiveni precipitacijom membranskih proteina pomoću otapala kloroform/metanol

Postupak izolacije membranskih proteina ponovljen je na stanicama ljudskog mozga, leukocitima i lizosomima (Slika 12) kako bi se dokazala primjenjivost metode izolacije i precipitacije membranskih proteina pomoću Tritona X-114 i organskih otapala na druga tkiva stanice i organele.

Kako bi se dobio uvid u uspješnost izolacije proteina i njihovog pročišćavanja od suviška detergenta provedena je SDS-PAG elektroforeza (poglavlje 3.2.8). U slučaju neuspješnog pročišćavanja od detergenta, on bi utjecao na uspješnost elektroforetskog razdvajanja i posljedičnu analizu. Na gel je nanesen proteinski marker te uzorci tritonske i solubilne faze dobiveni iz THP stanica precipitacijom s mješavinom organskih otapala kloroform/metanol. Kad se usporede tritonska i solubilna faza istog uzorka, može se primijetiti da solubilna faza ima veći intenzitet vrpci, tj. više proteina (Slika 13) što je i pretpostavka budući da u citoplazmi ima više proteina nego što ih ima na membrani.

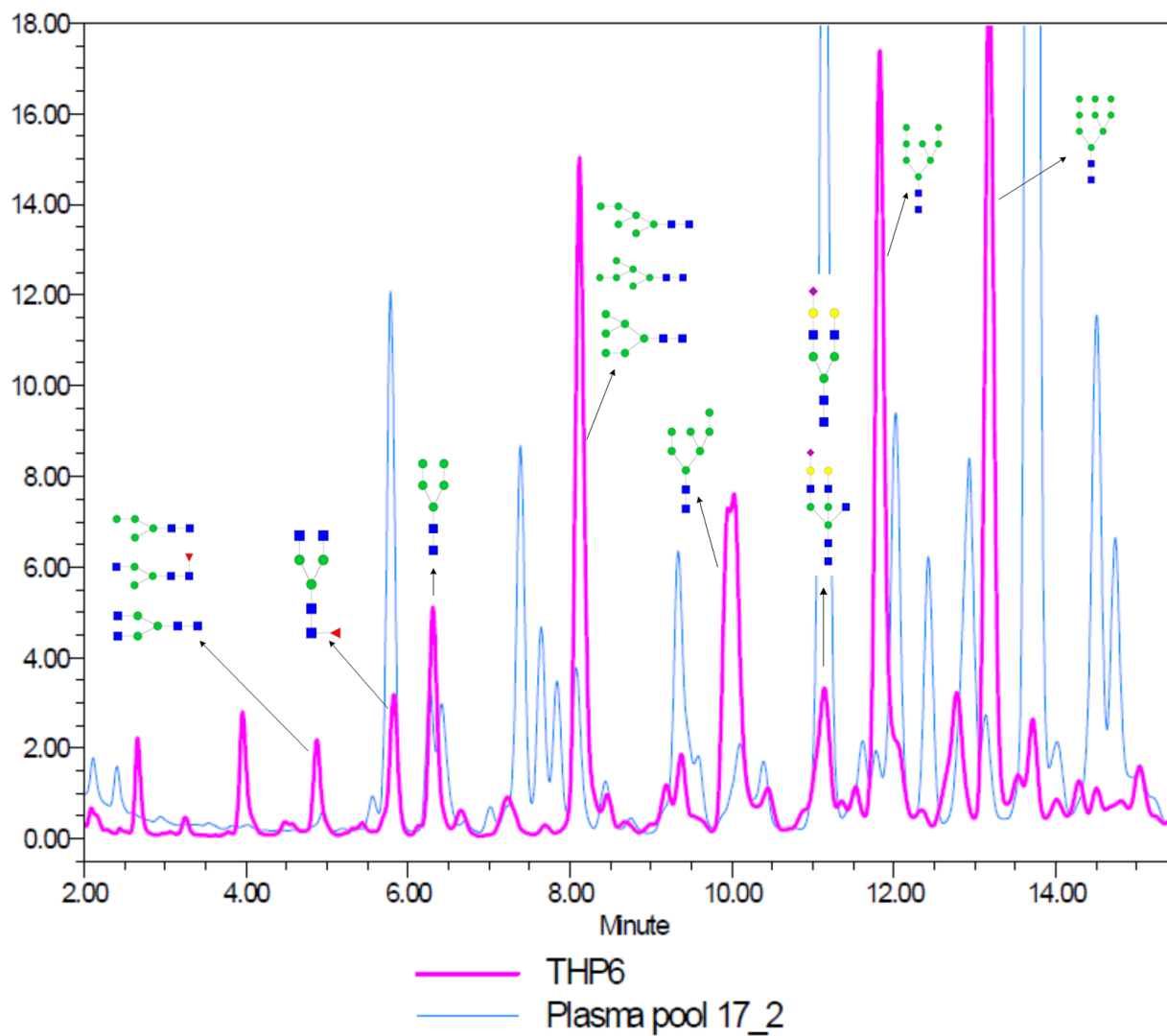


Tablica 11: Raspored uzoraka nanesenih na gel za elektroforezu (Slika 13)

Uzorak	Frakcija
A	PROTEINSKI MARKER
B	THP_T
C	THP_S

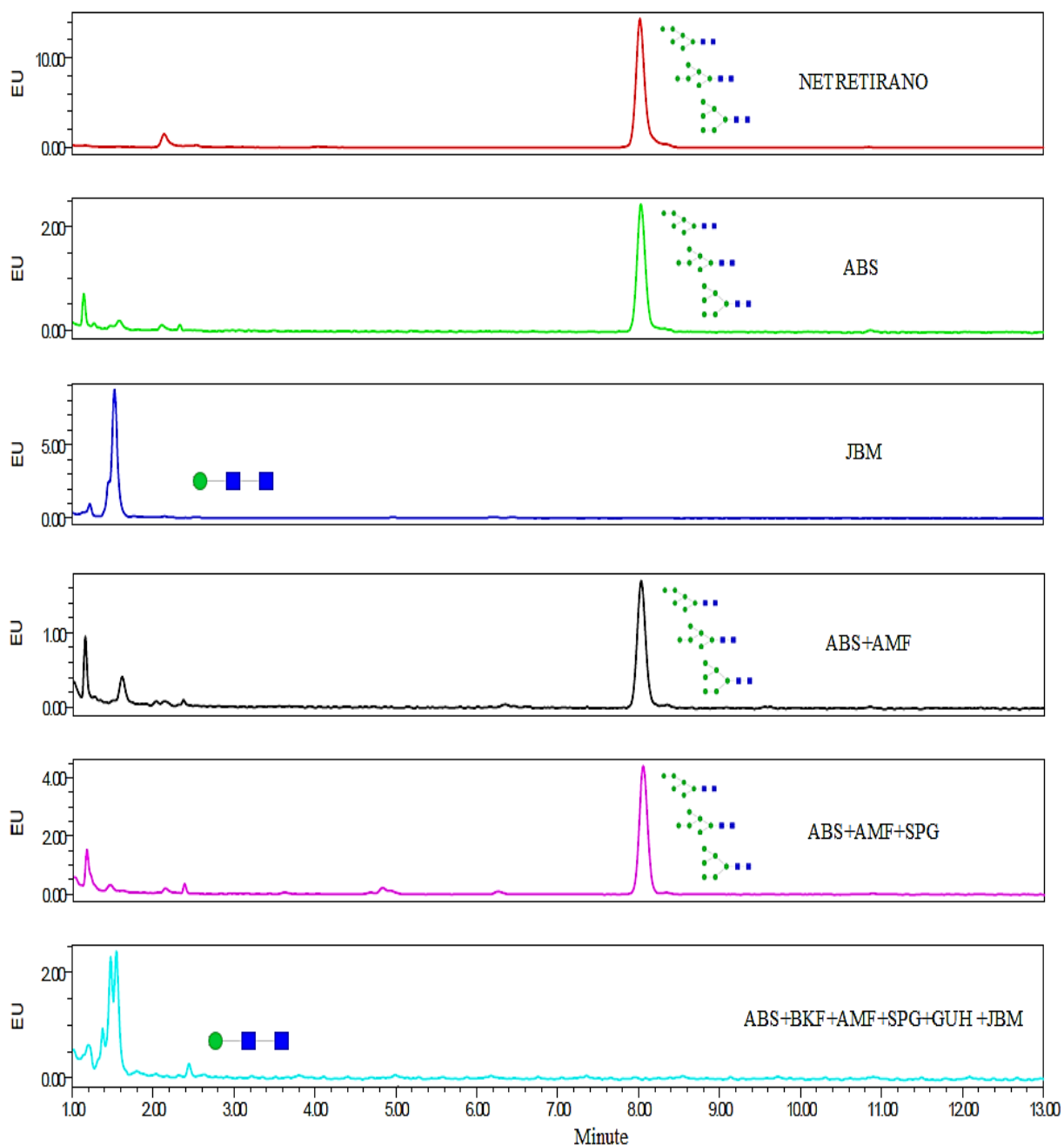
Slika 13: Gel elektroforeza proteina dobivenih precipitacijom organskim otapalima kloroform/metanol. (raspored uzoraka definiran je u Tablica 11)

Radi potvrde prisutnosti glikanskih struktura u dobivenim uzorcima, sakupljeni su pojedini kromatografski vršci (poglavlje 3.2.7.1). U njima se potencijalno nalazi jedna ili više glikanskih struktura. Oni su sekvencirani razgradnjom kombinacijom egzoglikozidaza koje otkidaju pojedine monosaharide s nereduktivnih krajeva glikana, a pokazuju određeni stupanj specifičnosti prema kidanju pojedinih veza (Slika 6). Na primjeru probranih kromatografskih vršaka dokazane su i identificirane glikanske strukture (Slika 14). Prethodno su usporedbom retencijskog vremena sakupljenog vrška s N-glikanskim kromatografskim profilom standarda plazme (kojem je poznat sastav N-glikana) pridružene potencijalne glikanske strukture. Sakupljeno je 14 kromatografskih vršaka (Slika 7), međutim identificirano je osam struktura. Promatranjem njihovih kromatograma s velikom sigurnošću možemo tvrditi da su to upravo te strukture, dok su za ostale kromatografske vrškove potrebne su daljnje analize.



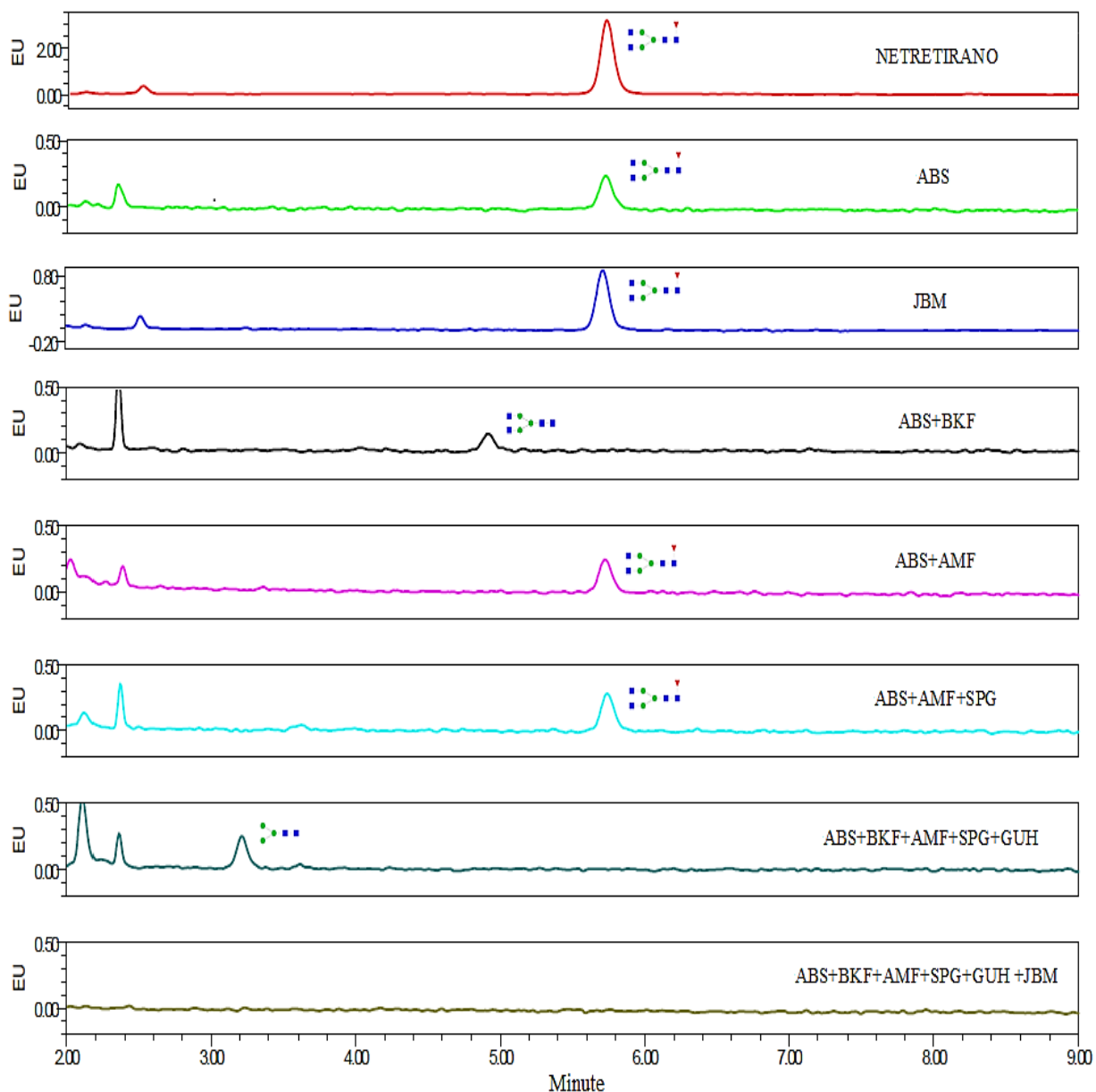
Slika 14: Kromatogram N-glikana s pridruženim identificiranim strukturama

Dobiveni kromatogrami se interpretiraju (poglavlje 3.2.7.7) na način da se kromatogram netretiranog uzorka uspoređuje sa kromatogramima uzoraka tretiranih enzimima (Slika 15 i Slika 16). Na primjeru M6 (oligomanozni tip (Slika 15)) i FA2 (kompleksni tip (Slika 16)) prikazan je način interpretacije dobivenih kromatograma.



Slika 15: Identifikacija strukture u kromatografskom vršku, oligomanozni tip glikana M6

Na Slika 15 vidi se da se kromatografski vršak glikana pomiče kad je uzorak tretiran enzimom JBM. Time je dokazana oligomanozna struktura glikana, a usporedbom s kromatogramom plazme i korištenjem GU vrijednosti (poglavlje 3.2.7.7) potvrđeno je da se radi o strukturi M6. Za točnu potvrdu izomera D1, D2, D3 potrebna je detaljnija analiza.



Slika 16: Identifikacija strukture u kromatografskom vršku, kompleksni tip glikana FA2

Na Slika 16 može se primijetiti pomak kromatografskog vrška kada se u smjesi nalazi ABS+BKF jer BKF miče fukozu vezanu na jezgru glikana. Također kromatografski vršak pomiče se kada se u smjesi nalazi ABS+BKF+AMF+SPG+GUH jer BKF opet miče fukozu vezanu na jezgru glikana, a GUH miče β GlcNAc. Na posljednjem kromatogramu kromatografskog vrška nema, jer mješavina egzoglikozidaza ukloni sve šećere i ostavi samo GlcNAc-GlcNAc-Man jezgru koja izlazi vrlo rano i ne može se primijetiti. Dobiveni kromatogrami su potvrdili sumnju o prisutnosti FA2 glikana.

5. RASPRAVA

Glikozilacija je najčešća posttranslacijska modifikacija i njezino proučavanje je važno zbog toga što varijacije u glikozilaciji proteina često vode promjeni u njihovoj funkciji, ali mogu biti povezane i s raznim bolestima (Axford, 2001). Međutim analiza glikana postala je iznimno važna i biofarmaceutskoj industriji zbog toga što glikozilacija ima učinak na fizikalno-kemijska svojstva proteina što se odražava na njihovu učinkovitost i sigurnost (ICH, 1999).

S obzirom da je izolacija proteina iz stanične membrane i njihova strukturna analiza zahtjevan proces zbog njihovog amfipatskog karaktera i male koncentracije u odnosu na citoplazmatske proteine, danas ne postoji puno metoda za njihovu izolaciju. Metode koje postoje često ne daju reproducibilne i smislene rezultate jer u procesu izolacije zaostaju i solubilni proteini koji se još mogu nalaziti u procesu glikozilacije (Schevchenko i sur., 2010). Upravo iz tog razloga je cilj ovog rada bio potvrditi da je prethodno razvijena optimirana metoda izolacije membranskih proteina pomoću Tritona X-114 (poglavljje 3.2.2) zaista učinkovita, a da je najbolja metoda precipitacije glikoproteina pomoću organskih otapala (Fekonja i Goričanec, 2014.). Izolacija proteina je provedena na THP stanicama, a za razdvajanje i detekciju glikana korištena je HILIC-UPLC metoda (poglavljje 1.3). Pročišćavanje proteina od viška detergenta potrebno je provesti kako bi mogli otpustiti N-glikane s proteina i pristupiti njihovoj analizi. S obzirom na činjenicu da glikani nemaju kromofore i nije ih moguće detektirati na kromatografskom detektoru, njih se obilježavalo bojom 2-aminobenzamidom u omjeru 1:1 što omogućava točno kvantitativno mjerenje i usporedbu između uzoraka (Ruhaak i sur., 2010).

Pročišćavanje proteina od detergenta izvedeno je pomoću acetona (Slika 8), aceton/metanola i kloroform/metanola (Slika 10) (poglavljje 3.2.3). Kao najbolji izbor se pokazala kombinacija kloroform/metanol jer je dobiven kromatogram najbolje razlučivosti i zadovoljavajućih intenziteta pikova (Slika 10). Također SDS PAGE je pokazala (Slika 13) da su uzorci uspješno pročišćeni od detergenta što se vidi po jasno vidljivim proteinskim vrpčama uzorka. Međutim sve metode pokazuju dosljednost glikanskog profila što se uočava ako se preklope kromatogrami dobiveni analizom proteina precipitiranih na različite načine (Slika 9), a dokazano je da intenzitet kromatografskih vršaka odnosno prinos N-glikana ovisi o količini izoliranih proteina, odnosno o početnoj količini stanica (Slika 11).

Metodom u kojoj se kombiniraju organska otapala postignuto je dobro pročišćavanje od suviška detergenta i zadovoljavajući prinos samih proteina te se može reći da kao takva ima potencijala za širu primjenu. Kako je metoda optimirana na THP stanicama, željela se potvrditi primjenjivost i na druge stanice, organele i tkiva. Zbog toga je postupak ponovljen na stanicama ljudskog mozga, leukocitima i lizosomima (Slika 12). Dobiveni kromatogrami su dobre razlučivosti, a prinos proteina, zaključujući po površini ispod kromatografskih vršaka je zadovoljavajući.

Također, primijećeno je da intenzitet kromatografskih vršaka ovisi o početnoj količini stanica (Slika 11), no moguće je da bi i neki drugi parametri, koji u ovom radu nisu promatrani, mogli također imati utjecaja na njihov intenzitet.

Izolacijom pojedinih kromatografskih vršaka i korištenjem specifičnih egzoglikozidaza moguće je potvrditi strukture pojedinih glikana. Međutim usporedbom sa glikanima plazme, mora postojati pretpostavka o kojem glikanu bi mogla biti riječ. Na kromatogramima se prati pomicanje kromatografskih vršaka kao posljedica digestije određenim egzoglikozidazama i donesu se određeni zaključci. Npr. ako pretpostavimo da određeni kromatografski vršak sadrži A2 glikan, isti bi se trebao pomaknuti samo pod djelovanjem GUH i JBM. Ako se pretpostavka potvrdi može se potvrditi i struktura. Također puno lakše je odrediti i potvrditi manje i oligomanozne strukture. Ovaj način identifikacije glikana je pouzdan, međutim trebalo bi identitet dodatno potvrditi masenom spektrometrijom.

6. ZAKLJUČCI

- Primjenom Tritona X-114 moguće je uspješno izolirati membranske proteine te ih odvojiti od solubilnih proteina, a izolirane proteine je od suviška detergenta moguće pročistiti kombinacijama organskih otapala gdje se kao najbolja pokazala kombinacija otapala kloroform/metanol koja je u konačnici rezultirala najboljim prinosom glikana te kromatogramima najbolje razlučivosti.
- Analizom dobivenih N-glikana pomoću HILIC-UPLC dobiveni su kromatogrami jednakih glikanskih profila što upućuje na njihovu dosljednost i ponovljivost metode, a intenzitet kromatografskih vršaka ovisi o količini stanica uzetih u analizu. Dobiveni kromatogrami se kao takvi mogu koristiti za analizu prisutnih glikana.
- Metoda izolacije membranskih proteina pomoću Tritona X-114 može se primijeniti i na druge stanice, tkiva i organele
- Izolacijom pojedinih kromatografskih vršaka moguće je dokazati prisutnost N-glikana, a neke čak i strukturno identificirati koristeći metodu razgradnje egzoglikozidazama

7. LITERATURA

Anugraham M, Jacob F, Nixdorf S, Everest-Dass AV, Heinzelmann-Schwarz V, Packer NH. Specific glycosylation of membrane proteins in epithelial ovarian cancer cell lines: glycan structures reflect gene expression and DNA methylation status. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13, 2213-32.

Axford J. The impact of glycobiology on medicine. *Trends Immunol*, 2001, 22, 237-239.

Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB. Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal Biochem*, 1995, 20, 230, 229-38.

Boersema PJ, Mohammed S, Heckcorresponding AJR. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391, 151-159.

Bordier C. Phase separation of integral membrane protein in Triton X-114 solution. *J Biol Chem*, 1981, 256, 1604-1607.

Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 402, 231-247.

Campbell MP, Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics*, 2008, 1,24, 1214-6.

Cooper G, Hausman RE. Stanica-molekularni pristup, 3rd ed, Medicinska naklada Zagreb, 2004, str. 305-307.

Drickamer K, Taylor ME. Introduction to Glycobiology. 2nd ed, Oxford University Press, USA, 2006, str. 23.

Fekonja N, Goričanec H. Izolacija membranskih proteina pomoću detergenta Triton X-114 u svrhu analize njihove N-glikozilacije. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Rektorova nagrada, Zagreb, 2014, str. 6.

Glycan Sequencing Using Exoglycosidases, 2015, <http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 25.05.2015.

International conference of harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH), Guideline Q6B, Specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, 1999, str. 2.

Kannicht C, Grunow D, Lucka L. Enzymatic sequence analysis of N-glycans by exoglycosidase cleavage and mass spectrometry--detection of Lewis X structures. *Methods Mol Biol*, 2008, 446, 255-66.

Knežević A. SOP2 for exoglycosidase digestion – v2, Zagreb, Genos, 2011, str. 3.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-5.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Scott MP. Molecular Cell Biology. 7th ed, New York, W. H. Freeman, 2004, str. 594-596.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. 7. izdanje, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 219,244.

Mastro R, Hall M. Protein delipidation and precipitation by tri-n-butylphosphate, acetone, and methanol treatment for isoelectric focusing and two dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 1999, 273, 313-315.

Menni C, Keser T, Mangino M, Bell JT, Erte I, Akmačić I, Vučković F, Pučić Baković M, Gornik O, McCarthy MI, Zoldoš V, Spector TD, Lauc G. Glycosylation of Immunoglobulin G: Role of Genetic and Epigenetic Influences. *PLoS ONE*, 2013, 8, 2.

Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397, 3457 – 3481.

Saldova R, Shehni AA, Haakensen VD, Steinfeld I, Hilliard M, Kifer I, Helland A, Yakhini Z, Borresen-Dale AL, Rudd PM. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res*, 2014, 13, 2314.

Shevchenko G, Sjödin MOD, Malmström D, Wetterhall M, Bergquist J. Cloud-Point Extraction and Delipidation of Porcine Brain Proteins in Combination with Bottom-Up Mass Spectrometry Approaches for Proteome Analysis. *J Proteome Res*, 2010, 9, 3904.

THP 1 Cell Line human, 2015., <http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 20.05.2015.

Triton™ X-114, 2015., <http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 20.05.2015.

Uchida Y, Tsukada Y, Sugimori T. Enzymatic Properties of Neuraminidases from *Arthrobacter ureafaciens*. *J Biochem*, 1979, 86 , 1573-1585.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. Essentials of Glycobiology. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2009.

Wessel D, Flugge UI. A method for quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, 1984, 138, 141-143.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1 SAŽETAK

Nina Fekonja

Unapređenje metode za obogaćivanje i analizu N-glikozilacije membranskih proteina

Analiza glikanskog dijela membranskih glikoproteina postala je važan analitički izazov zbog njihove izuzetne važnosti u međustaničnom prepoznavanju te interakcijama pojedinih molekula s receptorima na staničnoj površini. Brojni pokušaji izolacije membranskih glikoproteina naišli su na niz prepreka s obzirom na nedovoljnu ponovljivost metoda ili pak onečišćenje citosolnim glikoproteinima. Stoga je cilj ovog rada bio potvrditi učinkovitost i ponovljivost metode izolacije membranskih proteina s Triton X-114 i pročišćavanja organskim otapalima u svrhu analize njihove N-glikozilacije. Sama analiza N-glikana provedena je HILIC-UPLC kromatografijom. Korištene su stanice iz THP stanične linije, ali je ponovljivost potvrđena i na stanicama ljudskog mozga, leukocitima i lizosomima.

U metodama za pročišćavanje izoliranih membranskih proteina korištena su različita organska otapala pomoću kojih je dobiven precipitat proteina. Organska otapala koja su upotrijebljena bila su aceton, kombinacija aceton/metanol i kloroform/metanol, gdje se posljednja kombinacija pokazala najučinkovitijom, iako sve tri metode daju kromatograme jednakog glikanskog profila. Također je pokazano da početna količina stanica utječe na intenzitet kromatografskih vršaka. Radi potvrde prisutnosti glikanskih struktura u dobivenim uzorcima, sakupljeni su pojedini kromatografski vršci koji su sekvencirani razgradnjom kombinacijom egzoglikozidaza koje otkidaju pojedine monosaharide s nereduktivnih krajeva glikana, a pokazuju određeni stupanj specifičnosti prema kidanju pojedinih veza. Na taj način uspješno su dokazane i identificirane pojedine glikanske strukture.

Važnost ove studije je u napretku izolacije membranskih proteina čime je omogućen bolji uvid u njihovu N-glikozilaciju koja je, osim u dijagnostici i prognostici bolesti, danas važna i biofarmaceutskoj industriji zbog toga što glikozilacija ima učinak na fizikalno-kemijska svojstva proteina što se odražava na njihovu učinkovitost i sigurnost.

Ključne riječi: glikozilacija, membranski proteini, N-glikani, Triton X-114, precipitacija organskim otapalima, HILIC-UPLC, digestija egzoglikozidazama, strukturna identifikacija

8.2 SUMMARY

Nina Fekonja

Improvement of methods for enrichment and analysis of N - glycosylation of membrane proteins

Analysis of glycan part of membrane glycoproteins has become an important analytical challenge because of its high importance in intercellular recognition and interactions of molecules with receptors on the cell surface. Numerous attempts to isolate membrane glycoproteins have encountered a number of obstacles due to the lack of reproducibility of the method or pollution with cytosolic glycoprotein. Therefore, the aim of this study was to confirm the efficacy and reproducibility of the method of isolation of membrane proteins with Triton X-114 and its purification with organic solvents for the purpose of analyzing the N-glycosylation. The analysis of N-glycans was performed with HILIC-UPLC chromatography. Used cells were from THP cell lines, but the repeatability was confirmed with human brain cells, white blood cells and lysosomes.

In the method for purifying the isolated membrane proteins are used various organic solvents with which we got a protein precipitate. Organic solvents which have been used are acetone, combinations of acetone/methanol and chloroform/methanol, where the last combination came as most effective, although all three methods gave chromatograms with the same glycan profile. It was also found that the initial amount of cells affects the intensity of the chromatographic peak.

To confirm the presence of glycan structure in the obtained samples, individual chromatographic peaks were collected and sequenced with combination of exoglycosidases that are tearing certain non-reducing ends of the monosaccharides from glycans. Thus were successfully proven and identified some glycan structures.

The importance of this study is progress in isolation of membrane proteins thus providing a better insight into their N-glycosylation that is, except for the diagnosis and prognosis of disease, today very important in biopharmaceutical industry because glycosylation has an effect on the physical and chemical properties of the protein which is reflected in their effectiveness and safety.

Keywords: glycosylation, membrane proteins, the N-glycans, Triton X - 114, organic solvent precipitation, HILIC-UPLC, exoglycosidase digestion, structural identification

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UNAPREĐENJE METODE ZA OBOGAĆIVANJE I ANALIZU N-GLIKOZILACIJE MEMBRANSKIH PROTEINA

Nina Fekonja

SAŽETAK

Analiza glikanskog dijela membranskih glikoproteina postala je važan analitički izazov zbog njihove izuzetne važnosti u međustaničnom prepoznavanju te interakcijama pojedinih molekula s receptorima na staničnoj površini. Brojni pokušaji izolacije membranskih glikoproteina naišli su na niz prepreka s obzirom na nedovoljnu ponovljivost metoda ili pak onečišćenje citosolnim glikoproteinima. Stoga je cilj ovog rada bio potvrditi učinkovitost i ponovljivost metode izolacije membranskih proteina s Triton X-114 i pročišćavanja organskim otapalima u svrhu analize njihove N-glikozilacije. Sama analiza N-glikana provedena je HILIC-UPLC kromatografijom. Korištene su stanice iz THP stanične linije, ali je ponovljivost potvrđena i na stanicama ljudskog mozga, leukocitima i lizosomima.

U metodama za pročišćavanje izoliranih membranskih proteina korištena su različita organska otapala pomoću kojih je dobiven precipitat proteina. Organska otapala koja su upotrijebljena bila su aceton, kombinacija aceton/metanol i kloroform/metanol, gdje se posljednja kombinacija pokazala najučinkovitijom, iako sve tri metode daju kromatograme jednakog glikanskog profila. Također je pokazano da početna količina stanica utječe na intenzitet kromatografskih vršaka.

Radi potvrde prisutnosti glikanskih struktura u dobivenim uzorcima, sakupljeni su pojedini kromatografski vršci koji su sekvencirani razgradnjom kombinacijom egzoglikozidaza koje otkidaju pojedine monosaharide s nereduktivnih krajeva glikana, a pokazuju određeni stupanj specifičnosti prema kidanju pojedinih veza. Na taj način uspješno su dokazane i identificirane pojedine glikanske strukture.

Važnost ove studije je u napretku izolacije membranskih proteina čime je omogućen bolji uvid u njihovu N-glikozilaciju koja je, osim u dijagnostici i prognostici bolesti, danas važna i biofarmaceutskoj industriji zbog toga što glikozilacija ima učinak na fizikalno-kemijska svojstva proteina što se odražava na njihovu učinkovitost i sigurnost.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 39 stranica, 16 grafičkih prikaza, 11 tablica i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Glikozilacija, membranski proteini, N-glikani, Triton X-114, precipitacija organskim otapalima, HILIC-UPLC, digestija egzoglikozidazama, strukturna identifikacija

Mentor: **Dr. sc. Olga Gornik**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Olga Gornik**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Miranda Sertić, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: lipanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

IMPROVEMENT OF METHODS FOR ENRICHMENT AND ANALYSIS OF N-GLYCOSYLATION OF MEMBRANE PROTEINS

Nina Fekonja

SUMMARY

Analysis of glycan part of membrane glycoproteins has become an important analytical challenge because of its high importance in intercellular recognition and interactions of molecules with receptors on the cell surface. Numerous attempts to isolate membrane glycoproteins have encountered a number of obstacles due to the lack of reproducibility of the method or pollution with cytosolic glycoprotein. Therefore, the aim of this study was to confirm the efficacy and reproducibility of the method of isolation of membrane proteins with Triton X-114 and its purification with organic solvents for the purpose of analyzing the N-glycosylation. The analysis of N-glycans was performed with HILIC-UPLC chromatography. Used cells were from THP cell lines, but the repeatability was confirmed with human brain cells, white blood cells and lysosomes.

In the method for purifying the isolated membrane proteins are used various organic solvents with which we got a protein precipitate. Organic solvents which have been used are acetone, combinations of acetone/methanol and chloroform/methanol, where the last combination came as most effective, although all three methods gave chromatograms with the same glycan profile. It was also found that the initial amount of cells affects the intensity of the chromatographic peak.

To confirm the presence of glycan structure in the obtained samples, individual chromatographic peaks were collected and sequenced with combination of exoglycosidases that are tearing certain non-reducing ends of the monosaccharides from glycans. Thus were successfully proven and identified some glycan structures.

The importance of this study is progress in isolation of membrane proteins thus providing a better insight into their N-glycosylation that is, except for the diagnosis and prognosis of disease, today very important in biopharmaceutical industry because glycosylation has an effect on the physical and chemical properties of the protein which is reflected in their effectiveness and safety.

The thesis is deposited in the Central Library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Thesis includes: 39 pages, 16 figures, 11 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Glycosylation, membrane proteins, the N-glycans, Triton X - 114, organic solvent precipitation, HILIC-UPLC, exoglycosidase digestion, structural identification

Mentor: **Olga Gornik, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Olga Gornik, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Miranda Sertić, Ph.D. *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2015.